

HEMMENDE WIRKUNGEN
VON TAURIN UND γ -AMINOBUTTERSÄURE
AN SPINALEN MOTONEURONEN DES FROSCHES

Peter Grafe

1976
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Prof. Dr. E. Gerlach

Prof. Dr. K. Thureau

HEMMEDE WIRKUNGEN VON TAURIN UND γ -AMINOBUTTERSÄURE
AN SPINALEN MOTONEURONEN DES FROSCHES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Grafe

aus

München

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. ten Bruggencate
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Thureau
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	12. Oktober 1976

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A <u>EINLEITUNG</u>	5
B <u>METHODE</u>	11
1. Präparation, Experimentierkammer	11
2. Applikation in der Nährlösung	13
3. Iontophorese	14
4. Meßverstärker, Registriereinrichtungen	15
5. Membranleitfähigkeitsmessungen	15
6. Aufsuchen der Motoneurone	16
C <u>ERGEBNISSE</u>	17
1. Synaptische Potentiale bei Reizung der Hinterwurzeln	17
2. Wirkungen der Aminosäuren auf intrazellulär ableitbare Signale	20
2.1. Postsynaptische Potentiale	20
2.2. Membranpotential	21
2.3. Membranleitfähigkeit	24
2.4. Aktionspotentiale	24
3. Vergleich der Wirkungsstärke der Aminosäuren	27
3.1. GABA, Glycin und β -Alanin	27
3.2. Taurin und α -Alanin	28
3.3. Aminovaleriansäure und Aminocaprinsäure	31
4. Die Wechselwirkung der Aminosäuren mit Strychnin und Picrotoxin	31
4.1. Eigenwirkungen von Strychnin	31
4.2. Eigenwirkungen von Picrotoxin	32
4.3. Wirkungen der Aminosäuren bei gleichzeitiger Gabe von Strychnin	35

	Seite
4.4. Quantitative Untersuchungen der Strychnin-Blockierung	36
4.5. Wirkungen der Aminosäuren bei gleichzeitiger Gabe von Picrotoxin	39
D <u>DISKUSSION</u>	43
1. Diskussion der postsynaptischen Wirkung	43
2. Überlegungen zur funktionellen Bedeutung der verschiedenen Aminosäuren	46
2.1. Relative Wirkstärke	46
2.2. Neurochemische Befunde	48
2.3. Picrotoxin und Strychnin	49
2.4. Folgerungen	50
3. Vergleich mit Untersuchungen am Rückenmark der Katze	51
4. Ausblick	53
E <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	54
F <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	56

A EINLEITUNG

Bei Untersuchungen zur Aufklärung der chemischen Struktur von synaptischen Überträgersubstanzen (Transmitter) im Zentralnervensystem mehrten sich in den letzten Jahren die Hinweise, daß γ -Aminobuttersäure (GABA) die Erregbarkeit von Nervenzellen herabsetzen könne (Zusammenfassung bei CURTIS und WATKINS 1965). In diesem Zusammenhang verwendeten CURTIS, PHILLIS und WATKINS (1961) auch das isolierte Rückenmark der Kröte zur Beobachtung der Wirkung von GABA und einiger chemisch verwandter Aminosäuren. Bei diesen Experimenten lagen das isolierte Rückenmark in einer Nährlösung und die Vorder- und Hinterwurzeln der Rückenmarksegmente auf elektrischen Reiz- und Ableitelektroden. Die Aminosäuren wurden in die Nährlösung gegeben und die Wirkungen als Veränderungen extrazellulärer, an den Nervenwurzeln ableitbarer, Potentialformen beurteilt. Als Vorteile dieser Untersuchungstechnik beschrieben die Autoren die rasche Präparationszeit, lange Aufrechterhaltung der elektrischen Erregbarkeit des Nervengewebes und die Möglichkeit, die Substanzen direkt und in reproduzierbaren Dosen einwirken zu lassen. Bei den Untersuchungen beobachteten sie, daß GABA, Glycin, α -Alanin, β -Alanin, Taurin und andere Aminosäuren den Vorderwurzelreflex verringern konnten: Der Vorderwurzelreflex ist ein nach elektrischer Erregung der Hinterwurzel an der Vorderwurzel des gleichen Rückenmarksegmentes ableitbarer Reflex und entspricht Aktionspotentialen, die nach überschwelliger Erregung der Motoneurone in deren Axonen fortgeleitet werden (ECCLES 1946; BROOKHART, MACHNE und FADIGA 1959). Die Verringerung dieses Reflexes zeigt folglich, daß während der Einwirkung der Aminosäuren die Auslösung von Aktionspotentialen in den Motoneuronen verhindert wird, gibt aber keinen sicheren Anhalt für den genauen Wirkort. Zusätzliche Untersuchungen von CURTIS und seinen Mitarbeitern und spätere Arbeiten von TÉBÉCIS und PHILLIS (1967 und 1969) beschrieben ein weiteres Kennzeichen der Wirkung von GABA, Glycin und β -Alanin. Dabei konnten ohne elektrische Reizung der Hinterwurzeln während der Applikation dieser Aminosäuren Verschiebungen des zwischen den Ableitelektroden

an der Vorderwurzel meßbaren Potentialwertes beobachtet werden. Unter der Annahme, daß diese Potentialverschiebungen elektrototisch fortgeleiteten Membranpotentialänderungen der Motoneuronenmembran entsprechen (CURTIS et al. 1961), weisen diese Messungen darauf hin, daß durch die Aminosäuren das Membranpotential der Motoneurone verändert wird. Auch nach Zufügung von 20 mM Magnesium in die Nährlösung waren unter GABA und Glycin Potentialverschiebungen an den Vorderwurzeln des isolierten Frosch-Rückenmarkes meßbar (BARKER und NICOLL 1973). Da Magnesium in hohen Konzentrationen die Freisetzung der natürlichen synaptischen Transmitter blockiert (del CASTILLO und ENGBAER 1954) und damit die Weiterleitung präsynaptischer Vorgänge zu den Motoneuronen verhindert, legten diese Untersuchungen eine direkte postsynaptische Wirkung der Aminosäuren am Motoneuron nahe. Zusammengefaßt läßt sich aus den mit extrazellulären Messungen erhobenen Befunden am isolierten Rückenmark der Kröte bzw. des Frosches folgern, daß GABA, Glycin und andere Aminosäuren das Membranpotential der Motoneurone verändern und eine Hemmung der Erregbarkeit herbeiführen können. Zusätzliche Untersuchungen mit einigen krampferzeugenden Giften wiesen darauf hin, daß sich die postsynaptischen Wirkungen der Aminosäuren pharmakologisch unterscheiden lassen: Strychnin blockierte den Effekt von Glycin und β -Alanin, beeinflusste jedoch GABA nicht. Die Wirkung dieser Aminosäure konnte hingegen durch Picrotoxin und Bicucullin verringert werden (FUKUYA 1961; TÉBÉCIS und PHILLIS 1969; BARKER und NICOLL 1973).

Neben dem postsynaptischen Angriffsort fanden sich durch Messungen an den Hinterwurzeln auch Hinweise auf einen präsynaptischen Wirkort von GABA im Rückenmark des Frosches. An einer Hinterwurzel kann nach elektrischer Reizung der ventralen oder einer benachbarten dorsalen Wurzel ein depolarisierendes Potential abgeleitet werden, das der elektrototisch fortgeleiteten Depolarisation der Endstrecken der afferenten Fasern entspricht und Hinterwurzelpotential benannt wurde (BARRON und MATHEWS 1938; ECCLES und MALCOLM 1946). Durch die Depolarisation der afferenten Terminalen werden einlaufende Aktionspotentiale in ihrer Amplitude

verringert und damit ein Mechanismus ausgelöst, der als präsynaptische Hemmung bezeichnet wird (Übersicht bei SCHMIDT 1971). Bei Einwirkung von GABA auf das Rückenmark wurde ebenfalls eine Depolarisation an den Hinterwurzeln abgeleitet und deshalb auf eine Depolarisation der Endstrecken der afferenten Fasern durch diese Aminosäure geschlossen. Außerdem konnte der Effekt von GABA, als auch das Hinterwurzelpotential durch Picrotoxin und Bicucullin verringert werden. Aufgrund dieser Beobachtungen wiesen mehrere Untersucher auf eine mögliche Bedeutung von GABA als Transmitter der präsynaptischen Hemmung im Rückenmark des Frosches hin (SCHMIDT 1963; TÉBÉCIS und PHILLIS 1969; BARKER und NICOLL 1973; DAVIDOFF 1972 a, b). In einer neueren Arbeit kommen NICOLL und BARKER (1973) zu dem Schluß, daß für das Hinterwurzelpotential, das nach Reizung der ventralen Wurzel entsteht, auch β -Alanin oder Taurin eine Bedeutung als Überträgersubstanz der präsynaptischen Hemmung besitzen könnten.

Bei der Suche nach den synaptischen Überträgersubstanzen wurden anhand theoretischer Überlegungen Kriterien aufgestellt, die eine Substanz erfüllen muß, damit ihre Funktion als Transmitter anerkannt werden kann. Zwei wichtige Bedingungen sind physiologische und pharmakologische Übereinstimmung oder Identität (Literaturübersicht bei STEINER 1971): Mit physiologischer Übereinstimmung ist gemeint, daß die Wirkung des vermuteten Überträgerstoffes auf das postsynaptische Neuron mit dem durch synaptische Aktivierung hervorgerufenen Effekt identisch sein muß. Pharmakologische Übereinstimmung heißt, daß Substanzen, die die Wirkung des natürlichen Transmitters verstärken oder abschwächen, auch die Effekte des vermuteten Transmitters auf identische Art und Weise beeinflussen müssen.

Am Beispiel der postsynaptischen Hemmung bedeutet physiologische Identität, daß der Transmitterkandidat bei elektrophysiologischen Untersuchungen die gleichen Veränderungen hervorruft, wie das durch natürliche Erregung ausgelöste inhibitorische postsynaptische Potential (abgekürzt IPSP). Dieses beruht auf einer charakteristischen Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Anionen.

Gleichzeitig führt das IPSP bei einem normalen Ruhemembranpotentialwert zu einer Hyperpolarisation, die sich aber durch künstliche Hyperpolarisation der Membran in eine Depolarisation umkehren läßt. Dabei wird der Potentialwert, an dem das IPSP keine Polarisation bewirkt, als Gleichgewichtspotential bezeichnet (Zusammenfassung und Literatur bei ECCLES 1964). Um während der Applikation von Transmitterkandidaten an einer Nervenzelle Veränderungen des Membranpotentials und Leitfähigkeitserhöhungen genau messen zu können, sind intrazelluläre Ableitungen notwendig. Für solche Untersuchungen gewann die Technik der Mikroelektrophorese oder Iontophorese (CURTIS 1964) eine große Bedeutung. Bei dieser Methode können mit einer Kapillare einer mehrläufigen Elektrode intrazellulär abgeleitet und aus den anderen Kapillaren, die extrazellulär verbleiben, Substanzen dicht neben dem Zellkörper freigesetzt werden. Solche Untersuchungen an verschiedenen Neuronen des Zentralnervensystems der Katze haben gezeigt, daß einige kurzkettenige Aminosäuren das Membranpotential hyperpolarisieren und die Leitfähigkeit der Membran erhöhen können (Literaturübersicht bei CURTIS und JOHNSTON 1974). An Motoneuronen und Interneuronen des Rückenmarkes bewirkte die iontophoretische Applikation von Glycin, GABA und β -Alanin eine Hyperpolarisation des Membranpotentials und eine gleichzeitige Abnahme des Membranwiderstandes (WERMAN, DAVIDOFF und APRISON 1968; CURTIS, HÜSLI, JOHNSTON und JOHNSTON 1968 b; ten BRUGGENCATE und ENGBERG 1968). Zusätzliche Untersuchungen konnten auch eine Übereinstimmung des Gleichgewichtspotentials des IPSP mit dem Umkehrpotentialwert der Aminosäurewirkung zeigen (ten BRUGGENCATE und ENGBERG 1968), so daß alle diese Beobachtungen auf eine mögliche physiologische Übereinstimmung der Aminosäuren Glycin, GABA und β -Alanin und der natürlichen Transmitter hinweisen. Auch von Taurin wurde kürzlich berichtet, daß es das Membranpotential von Neuronen in der Medulla oblongata der Katze hyperpolarisieren und ihre Leitfähigkeit erhöhen kann, so daß auch dieser Aminosäure eine mögliche Bedeutung als Transmitter im Zentralnervensystem zukommt (HÜSLI, HAAS und HÜSLI 1973).

Am Rückenmark der Katze fanden sich auch Hinweise auf die pharmakologische Identität der Aminosäuren. So konnte beobachtet werden, daß einige natürliche inhibitorische Vorgänge nach einer Vergiftung mit Strychnin nicht mehr ausgelöst werden konnten, während andere hemmende Mechanismen durch Picrotoxin unterdrückt wurden (Literaturübersicht bei CURTIS und JOHNSTON 1974). Sollte eine der untersuchten Aminosäuren tatsächlich mit dem natürlichen Transmitter identisch sein, so müßte auch die Wirkung dieser Aminosäure durch die Blockierungsgifte der natürlichen Hemmung aufgehoben werden. Tatsächlich verhinderte Strychnin die hemmende Wirkung von Glycin an spinalen Neuronen der Katze und der Ratte (CURTIS et al. 1968 a, b und 1971; LARSON 1969; DAVIDOFF, APRISON und WERMAN 1969; de GROAT 1970; BISCOE, DUGGAN und LODGE 1972), während Picrotoxin den Effekt von GABA an diesen Nervenzellen abschwächte (DAVIDOFF und APRISON 1969; CURTIS, DUGGAN und JOHNSTON 1969; ENGBERG und THALLER 1970). Aufgrund dieser Ergebnisse unterscheidet man pharmakologisch nach CURTIS et al. (1968 a) zwischen GABA und GABA-ähnlichen Aminosäuren, deren Effekt durch Picrotoxin vermindert wird und Glycin und Glycin-ähnlichen Aminosäuren, die durch Strychnin in ihrer Wirkung blockiert werden. Taurin, α -Alanin und β -Alanin gehören zu den Glycin-ähnlichen Aminosäuren.

Intrazelluläre Ableitungen aus Motoneuronen des Frosches beschrieben als erste ARAKI, OTANI und FURUKAWA (1953). Sie untersuchten die Signalformen, die durch Reizung der Hinter- und Vorderwurzeln in den Motoneuronen ausgelöst werden konnten. In den nächsten Jahren verwendeten dann verschiedene Untersucher diese Technik zur Erforschung vielfältiger Probleme: KUNO (1957) beobachtete die Veränderungen der postsynaptischen Potentiale nach einer Strychninvergiftung; FADIGA und BROOKHART (1960, 1962) wiesen auf eine unterschiedliche Lokalisation von Synapsen der seitlichen Säule und der dorsalen Wurzelfasern an Zellkörper und Dendriten der Motoneurone hin; GRINELL (1966, 1970) erforschte die Wechselbeziehung zwischen Motoneuronen über dendro-dendritische Synapsen und KATZ und MILEDI (1963) leiteten spontane synaptische Miniaturpotentiale aus den Motoneuronen ab.

Intrazelluläre Ableitungen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Wirkungen einiger Aminosäuren auf das Membranpotential, die postsynaptischen Potentiale und die Membranleitfähigkeit von Motoneuronen des Frosches zu untersuchen. Besonders GABA, Glycin, α -Alanin, β -Alanin und Taurin wurden wegen ihrer oben beschriebenen hemmenden Einflüsse auf die Erregbarkeit spinaler Neurone des Frosches und der Katze angewandt. Am isolierten Rückenmark konnten insbesondere die Ergebnisse einer Applikation in die Nährlösung mit der iontophoretischen Einwirkung verglichen werden. Stabile intrazelluläre Ableitungen erlaubten es weiterhin, die Effekte von Picrotoxin und Strychnin auf die postsynaptischen Potentiale und die Aminosäurewirkungen zu beobachten. Dabei konnte durch Konzentrationsänderungen der blockierende Effekt von Strychnin auf einige der Aminosäuren nach quantitativen Gesichtspunkten untersucht werden.

B METHODE

Es wurde intrazellulär aus Motoneuronen der Lumbalsegmente des isolierten Frosch-Rückenmarkes abgeleitet. Das Rückenmark lag in einer Kammer, die mit Hilfe eines Pumpsystems kontinuierlich mit Ringer-Lösung durchspült wurde. Zwei Verfahren dienten dazu, die Aminosäuren auf das Rückenmark einwirken zu lassen: Bei der einen Art wurden sie in die Nährlösung gegeben und gelangten durch Diffusion in das Gewebe und zu den Nervenzellen; die andere Art war, die Substanzen mit Hilfe von Iontophoreseelektroden dicht neben dem Zellkörper freizusetzen. Abb. 1 zeigt ein Schema der Versuchsanordnung.

1. Präparation, Experimentierkammer

Die Frösche waren grüne Wasserfrösche (*Rana esculenta*) mit einem Gewicht zwischen 80 und 120 g. Nach Dekapitierung wurde das Rückenmark durch eine Wirbelsäuleneröffnung von ventral her freigelegt und Vorder- und Hinterwurzeln der 8. bis 10. Segmente (Nomenklatur nach ECKER, WIEDERSHEIM und GAUPP 1899) bis zum Spinalganglion präpariert. Die Präparation geschah unter einem Operationsmikroskop (max. Vergrößerung 40-fach; Präparationsdauer ca. 1/2 Std.). Das isolierte Rückenmark hat eine Länge von ungefähr 5 cm; es besitzt 11 Segmente. Die Segmente 8, 9 und 10 haben besonders lange und kräftige Wurzeln (Länge bis zum Spinalganglion ca. 1,5 cm); sie bilden den Plexus lumbosacralis und dessen Fasern ziehen hauptsächlich in den N. ischiadicus. Präpariert wurde in einem Präparationsbecken. Dieses war mit gekühlter (12° - 16°C) und mit durchgaster (O₂/CO₂-Gemisch) Ringer-Lösung gefüllt. Bei der Präparation brauchte man nicht auf Blutungen zu achten und keine Gefäße zu erhalten. Zur Ernährung und Erhaltung des Gewebes genügte die Ringer-Lösung. Nach der Präparation wurde das Rückenmark in eine Experimentierkammer (Abb. 1) eingelegt und dort im Bereich der Lumbalsegmente die Dura und Pia mater abgezogen, um eine Diffusion in diesem Gebiet zu erleich-

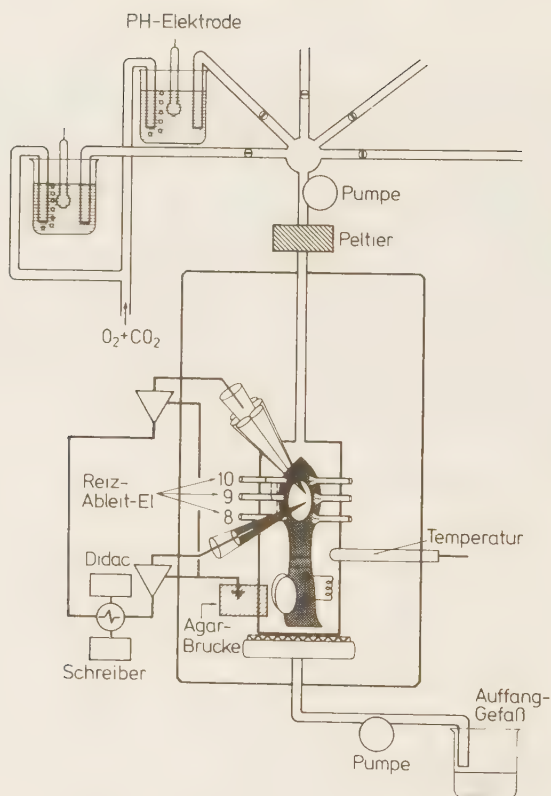


Abb. 1: Schema der Versuchsanordnung

Das isolierte Rückenmark des Frosches (schraffiert gezeichnet) liegt in einer Vertiefung der Experimentierkammer. Der helle Fleck im Bereich der Segmente 8 mit 10 zeigt die Stelle, wo die Rückenmarkshäute entfernt und mit der Einzelelektrode bzw. der Iontophoreseelektrode die Motoneurone aufgesucht wurden. Die Mechanik der Durchspülung, die Durchgasung, Temperaturkontrolle, Meßverstärker und Registriereinrichtung sind in der Abb. schematisch eingezeichnet.

tern und ein Eindringen der feinen Elektroden spitze möglich zu machen. Die Kammer bestand aus einem Plexiglasblock mit einer eingefrästen Rinne (Maße: 55 mm Länge, 4 mm Breite, 8 mm Höhe), in die das Rückenmark eingelegt und an deren Boden es mit feinen Nadeln befestigt wurde. Die seitliche Oberfläche des Rückenmarkes zwischen Vorder- und Hinterwurzeln lag in dem Bad oben. Die Nervenwurzeln einer Segmentseite wurden aus der Vertiefung herausgehoben und einzeln auf seitlich der Fräsung angebrachte Ag-Reizelektrodenpaare gelegt. Die Wurzeln waren nicht von Ringer-Lösung umspült und vor Austrocknung durch Bedeckung mit einem Paraffin-Vaseline-Gemisch geschützt. Mit Hilfe einer Rollenpumpe wurde die Kammer ständig durchspült. Das Badvolumen betrug 1,5 ml, die regulierbare Durchflußmenge zwischen 1,5 - 2,5 ml/min. Die Standard-Ringerlösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): NaCl 108,0, KCl 3,65, NaHCO₃ 12,0, CaCl₂ 2,0 und Dextrose 2 g/l. Die Lösung hatte in den Sommer- und Wintermonaten die gleiche Zusammensetzung. Sie wurde mit einem Gemisch aus O₂ (ca. 95 %) und CO₂ (ca. 5 %) durchgast; der pH (pH-Meter der Fa. Methrom) mit Hilfe eines Puffers (TES=Tris (hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthansulfonsäure) und der Durchgasung auf 7,4 gehalten. Ein Kühlsystem (Peltierelement Fa. Weston "Thermoprobe") diente zur Einstellung der Badtemperatur, die zwischen 5° und 30°C reguliert werden konnte. Während der Messungen betrug die Badtemperatur zwischen 12° und 18°C.

2. Applikation in der Nährlösung

Bei dieser Methode wurden die Testsubstanzen in Ringer-Lösung gelöst. Die Kammer war an ein Verteilersystem mit mehreren Schläuchen gekoppelt und konnte mit verschiedenen Lösungen getrennt voneinander durchspült werden. Zur intrazellulären Ableitung dienten Einzelelektroden, die aus Pyrex-Glaskapillaren (Durchmesser 1,5 mm) mit Hilfe eines Horizontalpullers auf einen Spitzendurchmesser von unter 1µm ausgezogen wurden. Überwiegend waren diese Elektroden mit einem Gemisch aus 70 % 2 M K-Citrat- und 30 % 2 M KCl-Lösung gefüllt; bei einigen Versuchen im Ver-

hältnis 90 % K-Citrat zu 10 % KCl und auch mit reiner 2 M K-Citrat-Lösung. Der Widerstand der Elektroden, gemessen in Ringer-Lösung, lag bei 30 - 60 MOhm, wobei die mit reiner K-Citrat-Lösung gefüllten Elektroden noch höhere Widerstände besaßen und auch wesentlich schlechtere Ableiteigenschaften zeigten.

3. Iontophorese

Mehrläufige Mikroelektroden erlauben die Technik der Mikroelektrophorese oder Iontophorese. Ein Elektrodenkanal dient dabei zur Ableitung, während aus den anderen Kanälen mit Hilfe von anodischen oder kathodischen Strömen geladene Moleküle an den Spitzenöffnungen freigesetzt werden können (siehe CURTIS 1964). Für die Versuche wurden Elektroden der konzentrischen Bauart verwendet. Sie bestanden aus einer zentralen Ableitelektrode (entsprechend der beschriebenen Einzelelektrode) und 5 oder 6 Rohren, die um diese konzentrisch angeordnet waren (Gesamtaußendurchmesser bei 5 Kanälen an der Spitze 4 - 6 μm). Der Abstand von der Ableitelektroden spitze zu der Spitze der Iontophoresekanäle betrug zwischen 50 und 90 μm , und damit war es möglich, intrazellulär mit der Zentralelektrode abzuleiten und gleichzeitig Substanzen aus den Iontophoresekanälen dicht außerhalb der Zellmembran freizusetzen (Genaueres über Charakteristik und Herstellung dieser Elektroden SONNHOF 1973). Bei den Versuchen wurden die Kanäle mit jeweils 0,5 M Lösungen von GABA (pH mit 1 n HCl eingestellt auf 4,5), Glycin (pH 3,5) und β -Alanin (pH 4) gefüllt. Picrotoxin wurde bis zur Sättigung und Strychnin 10 mM in einer 165 mM NaCl Lösung gelöst. Bei jeder Elektrode diente ein Kanal zur Kontrolle der Stromwirkung (gefüllt mit 165 mM NaCl Lösung). Ein Iontophoresegerät mit 6 voneinander unabhängigen Kanälen diente zur Erzeugung von konstanten Strömen im Bereich von 5 bis 450 nA $\pm$ 5 % (Unterteilung in 15 Stufen) bei Widerständen der Iontophoresekanäle im Bereich von 10 - 40 MOhm.

4. Meßverstärker, Registriereinrichtungen

Die Ableitelektrode (Einzelelektrode bei Applikation in der Nährlösung, Zentralelektrode bei Iontophorese) wurde über eine Ag-AgCl Brücke mit einem hochohmigen Meßverstärker verbunden. Die indifferente Elektrode (Ag-AgCl) hatte zur Vermeidung von Diffusionspotentialen mit dem Bad über eine Agar-Agar Brücke Kontakt. Zwei Kathodenstrahloszillographen (Typ 565 Tektronix mit den Einschubverstärkern Typ 2A63, 3A3, 3A9) und ein Potentiometerschreiber (Metrawatt; max. Frequenz 1,5 Hz, Linearität $\pm 0,5\%$) dienten zur Signalabbildung. Mit Hilfe eines Kleincomputers (Modell 1072 Nicolet bzw. Didac 800 Intertechnique) konnten mehrere Potentialverläufe (normalerweise 4) gemittelt werden.

5. Membranleitfähigkeitsmessungen

Zur Bestimmung der Membranleitfähigkeit wurde zwischen intrazellulärer Ableitelektrode und Referenzelektrode ein rechteckförmiger Gleichstromeimpuls angelegt (1-4 nA, 5-10 ms). Nach dem Ohm'schen Gesetz verursacht ein Strompuls einen Spannungsabfall, der vom Widerstand der Elektrode und der Membran abhängig ist. Deshalb konnte bei konstanter Größe des Strompulses und konstantem Elektrodenwiderstand eine Verkleinerung des Spannungsabfalles als eine Änderung des Membranwiderstandes gedeutet werden. Beispielsweise führte die Einwirkung der Aminosäuren zu einer Abnahme des Spannungsabfalles und folglich zu einer Verminderung des Membranwiderstandes (siehe Abb. 5). Vor jeder Messung wurde der über dem Elektrodenwiderstand auftretende Spannungsabfall mittels einer Wheatstone'schen Brücke abgeglichen, so daß Amplitude und Verlauf des Spannungsabfalles über der Membran am Oszillograph mit hoher Verstärkung abgebildet werden konnten.

6. Aufsuchen der Motoneurone

Die Struktur des Froschrückenmarkes beschrieben ECKER, WIEDERSHEIM und GAUPP (1899) in der "Anatomie des Frosches". SILVER (1942) untersuchte besonders die Motoneurone nach Größe, Lage und Anzahl und CRUCE (1974) erforschte die somatotopische Gliederung der Motoneurone im lumbalen Rückenmark. Anhand der Beobachtungen dieser Autoren wurde zum Aufsuchen der Motoneurone die Elektrode von der seitlichen Oberfläche mit Hilfe eines Mikromanipulators (Transvertex) in das Gewebe vorgeschoben (in Schritten von $2-6\mu\text{m}$). Durch elektrische Reizung der Vorderwurzeln konnten über rückläufige (=antidrome) Erregung in den Motoneuronen Aktionspotentiale ausgelöst werden. Die Aktionspotentiale wurden extrazellulär vom Gewebe weitergeleitet (Volumenleiter) und waren als "fokale Potentiale" (Amplitude $2-4\text{ mV}$, Dauer 5 ms) in der Nähe der Motoneurone ableitbar. Im Gebiet antidromer fokaler Potentiale war der Einstich in eine Zelle durch sprunghaftes Auftreten eines negativen Potentials gekennzeichnet. Für die Messungen wurden nur Motoneurone mit einem Membranpotential über 45 mV verwendet. Aus den Zellen konnte im Durchschnitt mehrere Stunden lang abgeleitet werden.

C ERGEBNISSE

1. Synaptische Potentiale bei Reizung der Hinterwurzeln

Nach dem Einstich in ein Motoneuron konnte bei elektrischer Reizung einer Hinterwurzel (=orthodrome Erregung) ein gemischtes postsynaptisches Potential (abgekürzt PSP) beobachtet werden. Dieses Potential bestand aus einem ersten depolarisierenden und einem späteren hyperpolarisierenden Anteil. Die hyperpolarisierende Ablenkung kehrte sich bei den meisten Zellen innerhalb der ersten Minuten nach dem Einstich spontan in einen depolarisierenden Verlauf um. Abb. 2A zeigt ein Beispiel dafür: Es sind 4 übereinander gesetzte PSP abgebildet, die nacheinander in den ersten 2 Minuten nach dem Einstich in ein Motoneuron ausgelöst wurden. Der hyperpolarisierende Anteil veränderte sich spontan in depolarisierender Richtung, so daß nach 2 Minuten ein reines depolarisierendes Potential bei orthodromer Reizung ausgelöst wurde. Dieser Potentialverlauf blieb dann aber während der weiteren Ableitung aus der Zelle konstant. Oft konnten nach dem Einstich in eine Zelle nur Potentiale mit reinem depolarisierenden Verlauf ausgelöst werden. Gab man in diesem Falle durch die Ableitelektrode depolarisierenden Strom, so drehte sich der spätere Anteil des PSP in ein hyperpolarisierendes Potential um. Nach dem Einstich in die Zelle der Abb. 2B beispielsweise konnte bei orthodromer Reizung nur ein depolarisierendes Potential ausgelöst werden (0 nA). Bei Depolarisation des Membranpotentials durch intrazelluläre Stromgabe verschiedener Stärke (4-8 nA dep.) veränderte sich der spätere Anteil des Potentials in hyperpolarisierende Richtung, bei hyperpolarisierender Stromgabe (4-6 nA hyp.) vergrößerte sich die Amplitude der Depolarisation. Der erste Anteil des gemischten PSP hingegen behielt bei den veränderten Membranpotentialwerten immer seine depolarisierende Richtung. Dieser Anteil des PSP mit der kürzeren Latenz (3 ms bei 16° C Badtemperatur) besitzt folglich kein Umkehrpotential in der Nähe des Ruhemembranpotentials und

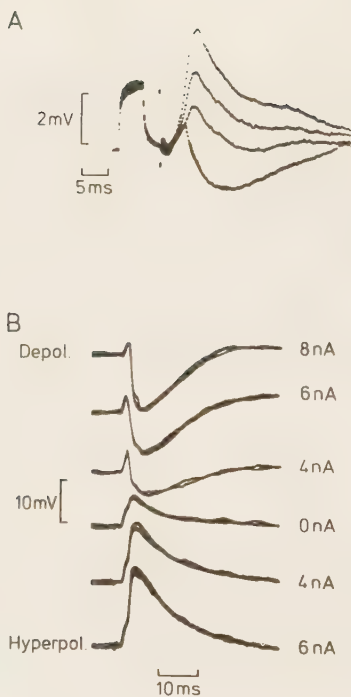


Abb. 2: Postsynaptische Potentiale (PSP) bei Reizung der Hinterwurzeln

- A: Spontane Polarisationsumkehr. Es sind 4 übereinandergesetzte PSP abgebildet, die in den ersten 2 Minuten nach dem Einstich in das Motoneuron ausgelöst wurden (ein PSP wurde jeweils aus 4 Strahldurchgängen gemittelt; vor den Signalen ist ein Testpuls abgebildet).
- B: Veränderungen des PSP bei intrazellulärer Stromgabe. Signal bei Einstich in das Motoneuron = 0 nA; Depolarisation des Membranpotentials mit 4 - 8 nA, Hyperpolarisation durch 4-6 nA Strom (es wurden jeweils 2 Signale übereinander fotografiert).
- Hyperpolarisierende Ablenkungen sind in dieser und in den nächsten Abbildungen nach unten gerichtet.

trägt deshalb die Kennzeichen eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP); der zweite Anteil mit der größeren Latenz, der Hyperpolarisation und dem Umkehrpotential in der Nähe des Ruhemembranpotentials dagegen die Kennzeichen eines inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) (FUKAMI 1961; FADIGA und BROOKHART 1962; KUBOTA und BROOKHART 1963; KATZ und MILEDI 1963).

Man nimmt allgemein an, daß bei der Entstehung eines IPSP eine kurzdauernde Leitfähigkeitserhöhung der Zellmembran für Chloridionen entscheidende Bedeutung besitzt (COOMBS, ECCLES und FATT 1955; LUX 1971; LLINAS und BAKER 1972; OZAWA und TSUDA 1973). Das Membranpotential strebt deshalb einem Wert zu, der dem Gleichgewichtspotential für Cl^- -Ionen entspricht und dieses wird bestimmt durch das Verhältnis der intrazellulären und extrazellulären Cl^- -Ionenkonzentration. Dieser ionale Mechanismus könnte die Ursache für die spontane Polarisationsumkehr und für den oft von vornherein depolarisierenden Verlauf des IPSP nach dem Einstich in die Zelle sein: COOMBS und Mitarbeiter (1955) zeigten, daß sich durch Erhöhung der intrazellulären Cl^- -Ionenkonzentration der hyperpolarisierende Verlauf eines IPSP in eine Depolarisation umdrehte. Innerhalb des Froschmotoneurons könnte sich die Cl^- -Ionenkonzentration entweder durch Diffusion aus der Ableitelektrode oder durch ein beim Einstich verursachtes Membranleck erhöhen. Da die Veränderungen des IPSP jedoch auch durch Cl^- -Ionen freie K^+ -Citrat Elektroden nicht verhindert wurden, ist die zweite Erklärung sehr wahrscheinlich, die KATZ und MILEDI (1963) bei ihren Untersuchungen an Froschmotoneuronen gegeben haben: Durch den Einstich in die Zelle wird die Membran beschädigt, NaCl aus dem Extrazellulärraum strömt in die Zelle und das veränderte Cl^- -Gleichgewichtspotential verursacht die Umkehr des IPSP in eine depolarisierende Richtung. Wie im folgenden gezeigt wird, ist die Polarisationsrichtung des IPSP entscheidend für die Wirkung der Aminosäuren auf das Membranpotential der Motoneurone.

2. Wirkungen der Aminosäuren auf intrazellulär ableitbare Signale

Glycin, α -Alanin, β -Alanin, γ -Aminobuttersäure (GABA) und Taurin wurden hinsichtlich ihrer Wirkungen auf die postsynaptischen Potentiale, das Membranpotential, Aktionspotentiale und Membranleitfähigkeit untersucht. Die Iontophorese und die Applikation in der Nährlösung zeigten ähnliche qualitative Wirkungen; die Wirkungen waren strom- bzw. konzentrationsabhängig.

Zum Vergleich der Wirkung von Glycin, α -Alanin, β -Alanin, GABA und Taurin wurde bei der Applikation in der Nährlösung eine Konzentration verwendet, bei der alle Aminosäuren deutliche Effekte zeigten (8×10^{-3} M). Eine Applikationszeit von 3 Minuten war ausreichend, um einen Gleichgewichtszustand der Wirkung zu erreichen. Die Zeit bis zum Wirkungseintritt an der Zelle war in erster Linie abhängig von der Transportzeit durch das Schlauchsystem (1,5-2 Minuten). Eine Bestimmung der tatsächlichen Diffusionszeit von der Oberfläche des Rückenmarkes bis zu den Motoneuronen konnte nicht durchgeführt werden, weil Wirbelbildungen in der Kammer (Beobachtung mit angefärbten Lösungen) eine klare Grenze zwischen reiner und aminosäurehaltiger Ringer-Lösung verhinderten. Die Diffusionszeit betrug aber sicher nicht mehr als 30 Sekunden.

2.1. Postsynaptische Potentiale

Die Aminosäuren verkleinerten die Amplitude der postsynaptischen Potentiale. Die Größe und Form der PSP waren von Zelle zu Zelle verschieden und auch die Wirkungsstärke einer Aminosäure bei gleicher Konzentration unterschiedlich bei verschiedenen Motoneuronen. Jedoch war die Art der hemmenden Wirkung an allen Zellen gleich. Abb. 3 zeigt ein typisches Beispiel dafür: Bei Reizung der Hinterwurzel wurde in dieser Zelle ein depolarisierendes PSP ausgelöst, das durch Stromanalyse als ein Gemisch aus EPSP und depolarisierendem IPSP identifiziert werden konnte (ähnlich dem PSP der Abb. 2B). Die Einwirkung von GABA (8×10^{-3} M

in der Ringer-Lösung) führte zu einer Verkleinerung der Amplitude des PSP um ca. 80 % und gleichzeitig zu einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials um 6 mV. Nach Beendigung der Applikation kam es dann innerhalb von 5 Minuten zur Repolarisation und zur Vergrößerung des PSP bis zur Ausgangssituation. Auch Glycin, α -Alanin, β -Alanin und Taurin veränderten die postsynaptischen Potentiale an anderen Motoneuronen in entsprechender Weise.

2.2. Membranpotential

Die Aminosäuren führten zu einer Veränderung des Membranruhepotentials, die immer der Polarisationsrichtung des IPSP entsprach. Da sehr häufig kurz nach dem Einstich in die Zelle sich der hyperpolarisierende Verlauf des IPSP spontan in depolarisierende Richtung veränderte (Abb. 2A), oder von vornherein nur ein depolarisierendes IPSP ausgelöst werden konnte (Abb. 2B), verursachten Glycin, α -Alanin, β -Alanin, GABA und Taurin überwiegend Depolarisationen des Membranpotentials. Die iontophoretische Applikation benötigte jedoch viel weniger Zeit bis zum Wirksamwerden an der Zelle als die Applikation in der Nährlösung, und deshalb konnten mit dieser Technik kurz nach dem Einstich in die Zelle und vor der spontanen Umkehr öfters Hyperpolarisationen der Membran durch die Aminosäuren beobachtet werden. Selten nur blieb ein IPSP über längere Zeit konstant in hyperpolarisierender Richtung. An dem Motoneuron der Abb. 4A war dies der Fall und durch Applikation in der Ringer-Lösung führten GABA (3 Minuten nach dem Einstich), β -Alanin (22 Min.) und Glycin (48 Min.) zu einer Hyperpolarisation. Zusätzlich bewirkten alle Aminosäuren eine Verkleinerung der Amplitude des IPSP und β -Alanin auch des EPSP. Während der weiteren Ableitung aus der Zelle veränderte sich nach etwa 2 Stunden dann das IPSP spontan in depolarisierende Richtung (Abb. 4B). Ab diesem Zeitpunkt verursachten dann Glycin (185 Min.), β -Alanin (201 Min.) und GABA (223 Min.) ebenfalls eine Depolarisation des Membranpotentials.

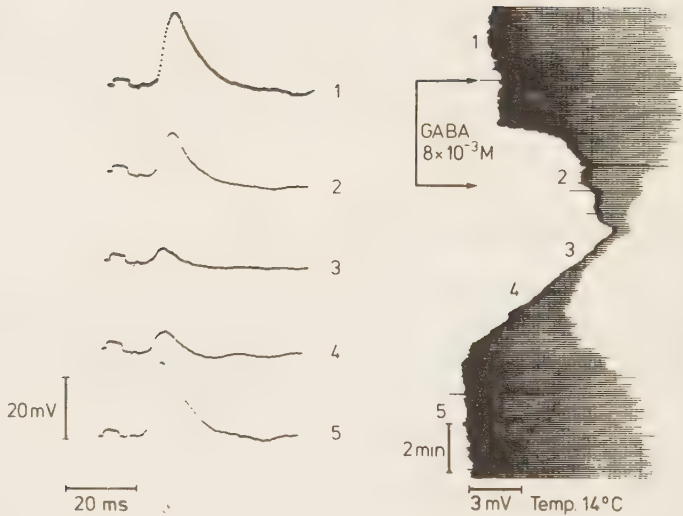


Abb. 3: GABA-Wirkung auf postsynaptische Potentiale (PSP)

Auf der linken Seite der Abb. sind die PSP mit der schnellen Zeitschreibung des Oszillographen abgebildet. Die rechte Seite (von oben nach unten zu lesen) zeigt mit langsamer Zeitschreibung das Ruhemembranpotential und die PSP, die mit einer Reizfrequenz von 0,2 Hz ausgelöst wurden und als Striche senkrecht zum Membranpotential erscheinen. GABA $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ führte zur Depolarisation der Zelle (in der Abb. Auslenkung nach rechts). Die zugeordneten Zahlen geben den Zeitpunkt an, an dem die abgebildeten PSP ausgelöst wurden (die Abb. zeigt PSP, die aus 4 Signalen gemittelt wurden).

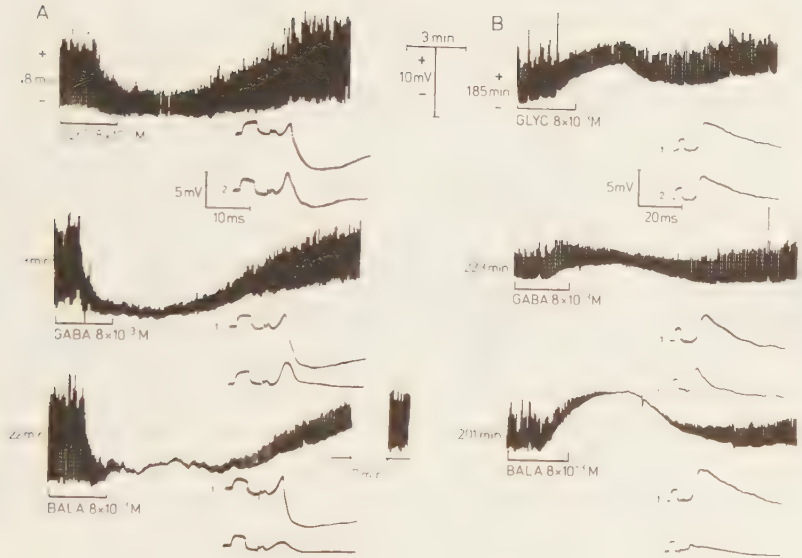


Abb. 4: Membranpotentialänderungen während der Aminosäuren-Wirkung

A: Ableitung von einem Motoneuron mit einem hyperpolarisierenden IPSP.

Die Membranpotentialschreibung ist durch PSP, die als Striche erscheinen, überlagert (Reizfrequenz 0,2 Hz). Unterhalb jeder Membranpotentialschreibung sind die Veränderungen des PSP abgebildet (1: Kontrolle, 2: PSP während max. Aminosäure-Wirkung). Links von jeder Aktion ist der Zeitpunkt nach dem Einstieg in die Zelle angegeben. BALA ist eine Abkürzung für β -Alanin.

B: Ableitung aus dem gleichen Motoneuron (wie bei A) nach spontaner Veränderung des IPSP in einen depolarisierenden Verlauf.

2.3. Membranleitfähigkeit

Die Aminosäuren erhöhten die Leitfähigkeit der Zellmembran (über die Meßtechnik s. Methode). Als Beispiel zeigt die Abb. 5 eine Membranleitfähigkeitsmessung an einem Motoneuron während der Einwirkung von GABA und Taurin. GABA in einer Konzentration von 8×10^{-3} M und Taurin von 10^{-3} M führten zu einer Depolarisation des Membranpotentials und zu einer Verkleinerung der Amplitude des PSP. Gleichzeitig konnte während dieser Veränderungen eine Abnahme der Amplitude des hyperpolarisierenden elektrototischen Potentials beobachtet werden (entsprechend einem Spannungsabfall bei einem Gleichstrompuls in diesem Fall von 5 ms Dauer und 2 nA Stromstärke). Diese Beobachtung zeigt folglich, daß GABA und Taurin die Membranleitfähigkeit des Motoneurons erhöhten. Zusätzlich läßt sich aus einem Vergleich der relativen Wirkstärke ableiten, daß Taurin in einer Konzentration von 10^{-3} M sowohl eine stärkere Membranleitfähigkeitserhöhung als auch eine ausgeprägtere Verkleinerung der Amplitude des PSP bewirkte als GABA mit einer Konzentration von 8×10^{-3} M.

2.4. Aktionspotentiale

Die Aminosäuren konnten die Auslösung sowohl eines orthodromen als auch eines antidromen Aktionspotentials blockieren. Als Beispiel zeigt die Abb. 6 die Wirkung von iontophoretisch appliziertem Glycin. Durch einen überschwelligen Reiz wurde in diesem Motoneuron ein orthodromes Aktionspotential ausgelöst (Abb. 6B). Wenige Sekunden nach Beginn der iontophoretischen Applikation von Glycin mit 48 nA Stromstärke war die Bildung des Aktionspotentials blockiert und zusätzlich die Amplitude des PSP verkleinert. Außerdem konnte eine Depolarisation des Membranpotentials um 5 mV beobachtet werden.

Das antidrome Aktionspotential an einem Motoneuron besteht aus 2 Komponenten: Dem IS-Anteil, der der Erregungsausbreitung am Initialsegment des Neurons entspricht und dem SD-Anteil, der

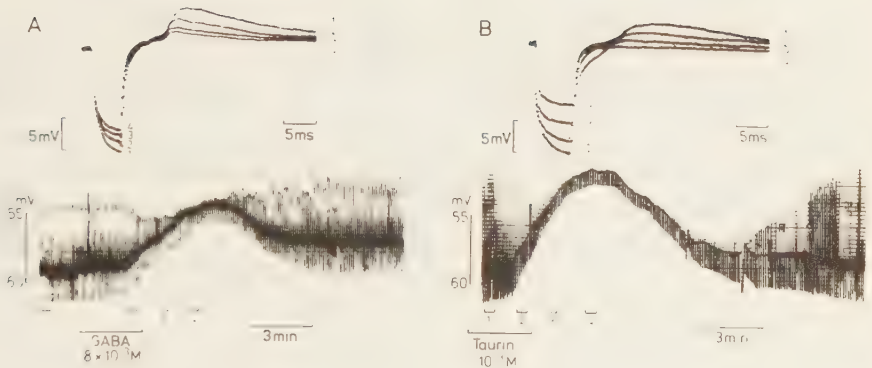


Abb. 5: Membranleitfähigkeitsänderungen während Aminosäuren-Wirkung

obere Reihe: zeigt jeweils das elektrotonische Potential, gefolgt von einem PSP. 4 Stationen während der Aminosäuren-Wirkung sind übereinandergesetzt (entsprechend den zugeordneten Balken unter der Membranpotentialschreibung).

untere Reihe: Membranpotentialschreibung mit überlagerten PSP und dem hyperpolarisierenden elektrotonischen Potential (2 nA Stromstärke, 5 ms). Die langsame Einstellzeit des mechanischen Schreibers führt zu einer relativ geringeren Amplitude des elektrotonischen Potentials im Vergleich zur Amplitude des PSP.

A: zeigt die Wirkung von GABA $8 \times 10^{-3} \text{ M}$

B: zeigt an der gleichen Zelle den Effekt von Taurin 10^{-3} M .

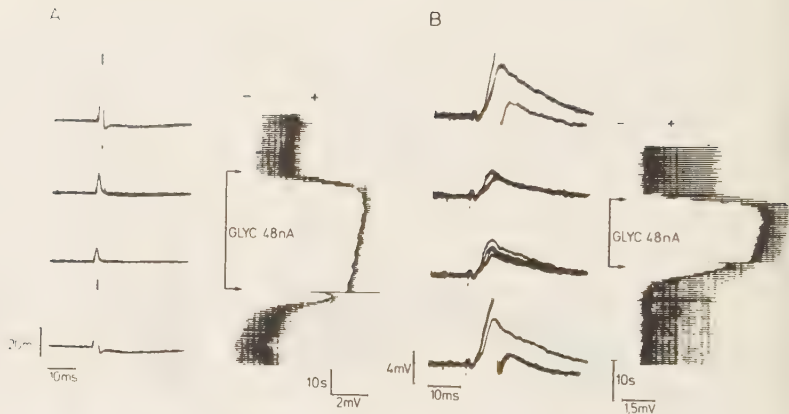


Abb. 6: Veränderungen des antidromen und orthodromen Aktionspotentials während der iontophoretischen Einwirkung von Glycin

- A: Rechts ist die Membranpotentialschreibung mit überlagerten Aktionspotentialen aufgetragen. Der mechanische Schreiber registriert wegen der langsamen Einstellzeit nur die Nachhyperpolarisation des Aktionspotentials. Links sind einzelne antidrome Aktionspotentiale während der iontophoretischen Einwirkung von Glycin mit 48 nA Stromstärke abgebildet (im zeitlichen Verlauf von oben nach unten; in der zweiten Reihe sind zwei Strahldurchgänge übereinander gesetzt).
- B: Links sind die Veränderungen des orthodromen Aktionspotentials abgebildet. Wegen der großen Verstärkung am Oszillograph ist nur der ansteigende Teil des Aktionspotentials sichtbar. Glycin führt zu einer Blockierung des orthodromen Aktionspotentials und zusätzlich zu einer Verringerung der Amplitude des PSP (es wurden jeweils mehrere Strahldurchgänge übereinander abgebildet). Rechts daneben ist die Membranpotentialschreibung aufgetragen.

durch die Erregungsfortleitung in die Soma- und Dendritenmembran entsteht (ECCLES 1964). Glycin ebenfalls mit 48 nA Stromstärke iontophoretisch freigesetzt, wirkte an der gleichen Zelle auch auf das antidrome Aktionspotential (Abb. 6A). Nach dem Beginn der Applikation kam es während einer Depolarisation des Membranpotentials zuerst zu einer Verkleinerung und später zu einer Blockierung des SD-Anteiles. Dann wurde auch die Amplitude des noch auslösbaren IS-Anteiles während des maximalen Glycin-Effektes weiter verringert, aber nicht vollständig blockiert. Ungefähr 10 Sekunden nach Beendigung der Glycin-Applikation waren die Blockierung des antidromen und orthodromen Aktionspotentials beendet und die Ausgangssignale wieder vorhanden. Auch mit der Applikation in der Nährlösung konnten durch die Aminosäuren die gleichen Veränderungen beobachtet werden.

3. Vergleich der Wirkungsstärke der Aminosäuren

Als Maß für die Wirkungsstärke der Aminosäuren wurde bei diesem Vergleich die Verkleinerung der Amplitude der postsynaptischen Potentiale verwendet.

3.1. GABA, Glycin und β -Alanin

Besonders umfangreiches Ergebnismaterial konnte über die relative Wirkstärke von GABA, Glycin und β -Alanin sowohl mit der Badmethode als auch mit der iontophoretischen Applikation gewonnen werden. Die Resultate sind in der Abb. 7 zusammengefaßt; sie stammen von intrazellulären Ableitungen aus 118 Motoneuronen von 52 Rückenmark-Präparationen. Die Aminosäuren wurden bei der Badapplikation überwiegend mit einer Konzentration von 8×10^{-3} M in ihrer relativen Wirkstärke verglichen: Von 72 Zellen war GABA in 68 Fällen stärker wirksam als Glycin, bei 4 Motoneuronen hatten sie einen ähnlich starken Effekt. β -Alanin verringerte die Amplitude der PSP immer stärker als GABA (Messungen an 40 Zellen) und Glycin (Messungen an 26 Zellen), so daß insgesamt β -Alanin die größte Wirkstärke bei der Badapplikation zeigte, gefolgt von

GABA und Glycin (Abb. 7A). Das gleiche Resultat erbrachten die Untersuchungen mit der iontophoretischen Applikation: Bei gleicher Stromstärke führte β -Alanin zu einer stärkeren Hemmung als GABA (Messungen an 6 Zellen) und Glycin (Messungen an 3 Zellen), während GABA an 11 von 12 Motoneuronen den hemmenden Effekt von Glycin übertraf (Abb. 7B). Als Beispiel zeigt die Abb. 7C die Effekte von Glycin, GABA und β -Alanin bei iontophoretischer Einwirkung (40 nA) auf das Membranpotential und das PSP eines Motoneurons. Wie bei der Badapplikation führten die Aminosäuren zu einer Verkleinerung der Amplitude des PSP und - entsprechend der Verlaufsrichtung des IPSP - zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Jedoch hatten die Veränderungen einen wesentlich schnelleren zeitlichen Ablauf: Sowohl der Wirkungseintritt, als auch der maximale Effekt und die Rückkehr zur Ausgangssituation konnten innerhalb weniger Sekunden beobachtet werden. Quantitativ gesehen verringerte auch bei iontophoretischer Applikation β -Alanin die Amplitude des PSP am deutlichsten, gefolgt von GABA und Glycin, das den schwächsten Effekt zeigte.

3.2. Taurin und α -Alanin

Die Wirkungen von α -Alanin und Taurin wurden nur mit der Badapplikation untersucht. Für α -Alanin ergab sich dabei durch Beobachtungen an 12 Motoneuronen von 5 Rückenmark-Präparationen eine relative Wirkstärke, die stärker als GABA aber schwächer als β -Alanin zu beurteilen ist (Abb. 8). Dagegen hatte Taurin den stärksten hemmenden Effekt aller Aminosäuren (Messungen an 36 Zellen von 18 Rückenmark-Präparationen). In der Abb. 8 wird die Wirkung von Taurin in einer Konzentration von 10^{-3} M mit GABA, α -Alanin und β -Alanin in einer Konzentration von 8×10^{-3} M verglichen. Taurin verkleinerte dabei mit dieser Konzentration die Amplitude des PSP in gleicher Stärke wie β -Alanin, so daß aus diesem Befund und entsprechenden Ergebnissen an anderen Motoneuronen die Wirkung von Taurin sogar als wesentlich stärker als der Effekt von β -Alanin bezeichnet werden kann.

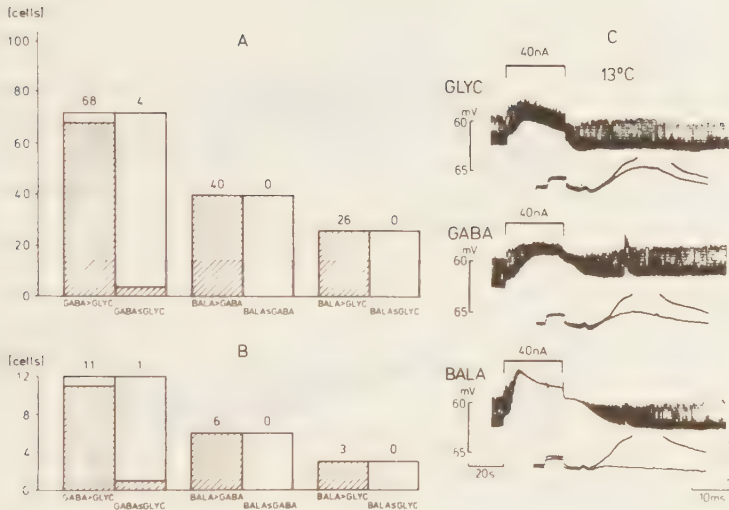


Abb. 7: Vergleich der relativen Wirkstärke von GABA, Glycin und β -Alanin

- A: Vergleich der relativen Wirkstärke von GABA, Glycin und β -Alanin mit der Badapplikation
- B: Vergleich der relativen Wirkstärke von GABA, Glycin und β -Alanin bei iontophoretischer Applikation
- C: Als Beispiel für die iontophoretische Applikation ist die Wirkung aller 3 Aminosäuren bei 40 nA Stromstärke abgebildet. Unterhalb der jeweiligen Registrierung des Membranpotentials sind die Kontrollamplitude (1) des PSP und die maximale Verkleinerung (2) übereinandergesetzt (zum Vergleich bei der Badapplikation Abb. 4B).

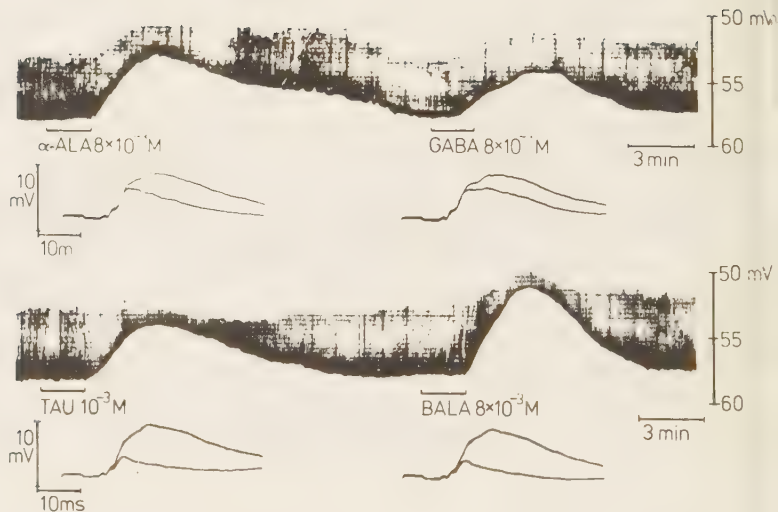


Abb. 8: Vergleich der relativen Wirkstärke von α -Alanin, GABA, Taurin und β -Alanin an einem Motoneuron

In der jeweils oberen Zeile ist die Registrierung des Membranpotentials mit überlagerten PSP aufgetragen. Darunter sind 2 gemittelte PSP übereinander abgebildet, die der Kontrollamplitude und dem maximalen Effekt entsprechen. Taurin in einer Konzentration von 10^{-3} M verringert die Amplitude des PSP wie β -Alanin in einer Konzentration von 8×10^{-3} M.

3.3. Aminovaleriansäure und Aminocapronsäure

An einigen Motoneuronen wurden weiterhin die Wirkungen von 5-Aminovaleriansäure (AVA) und 6-Aminocapronsäure (ACA) auf die postsynaptischen Potentiale und das Membranpotential untersucht. AVA und ACA besitzen ebenfalls zur Carboxylgruppe endständige Aminogruppen wie Glycin, β -Alanin und GABA, unterscheiden sich jedoch von diesen durch die größere Kettenlänge: AVA verursachte nur in Konzentrationen von $1,5 - 2 \times 10^{-2}$ M eine Membranpolarisation und eine Verkleinerung der PSP, während ACA auch mit 2×10^{-2} M keine erkennbare hemmende Wirkung zeigte. Die Verlängerung der Kettenlänge führte also in Übereinstimmung mit den extrazellulären Messungen von CURTIS und seinen Mitarbeitern (1961) zu einer Abnahme der Wirkungsstärke.

4. Die Wechselwirkung der Aminosäuren mit Strychnin und Picrotoxin

Die Möglichkeit, mehrere Stunden lang aus einzelnen Motoneuronen abzuleiten, bot gute Voraussetzungen, die Veränderungen der intrazellulären Signalformen und die Wirkung der Aminosäuren vor und nach der Applikation von Strychnin (an 15 Rückenmark-Präparationen) und Picrotoxin (an 14 Rückenmark-Präparationen) zu untersuchen. Beide krampferzeugenden Gifte führten zur Entstehung häufiger, spontaner Depolarisationen des Membranpotentials und zu charakteristischen Veränderungen der postsynaptischen Potentiale.

4.1. Eigenwirkungen von Strychnin

Die Einwirkung von Strychnin in Konzentrationen von 10^{-4} M bis 5×10^{-4} M für 10 bis 15 Minuten bei Applikation in der Ringer-Lösung führte zu ausgeprägten Veränderungen der postsynaptischen Potentiale und zur Auslösung spontaner Depolarisationen des Membranpotentials (KUNO 1957). In der Abb. 9 sind diese Veränderungen zusammengefaßt: 8 Minuten nach dem Beginn der Ein-

wirkung von Strychnin in einer Konzentration von 5×10^{-4} M begannen sich die postsynaptischen Potentiale zu vergrößern und es zeigten sich spontane, kurzdauernde Depolarisationen des Membranpotentials. Zusätzlich kam es zu einer langsamen Verschiebung des Membranpotentials um etwa 6 - 8 mV in depolarisierender Richtung (Abb. 9A). Die PSP veränderten sich bei allen Strychnin-Experimenten in charakteristischer Weise: Die Amplitude des Anfangsteiles des PSP blieb konstant, während sich die Dauer des Potentials wesentlich verlängerte. Ungefähr 40 ms nach dem Beginn des PSP entwickelte sich ein depolarisierender Potentialverlauf mit einer Amplitude von etwa 15 mV und einer Zeitdauer von 120 ms. Diese Depolarisation führte zur Auslösung mehrerer Aktionspotentiale, so daß jeder elektrische Reiz an der Hinterwurzel zu einer Entladungssalve des Motoneurons führte (Abb. 9B). Solche Veränderungen der PSP konnten auch nach der Einwirkung von Strychnin in der sehr geringen Konzentration von 10^{-6} M beobachtet werden (Abb. 13). Die spontanen Membranpotentialdepolarisationen entwickelten sich erst bei Konzentrationen von 10^{-4} M und 5×10^{-4} M und zeigen damit ein höheres Stadium der Strychninvergiftung an (KUNO 1957). Sie traten in einer ziemlich regelmäßigen Frequenz auf mit einer Amplitude von 25 mV, einer Zeitdauer von 500 ms und führten zur Auslösung von 16-25 Aktionspotentialen (Abb. 9C,D). Die Veränderungen nach einer Strychninvergiftung waren auch nach Auswaschen über mehrere Stunden mit Ringer-Lösung nicht abgeschwächt und sind deshalb wahrscheinlich als nicht reversibel zu bezeichnen.

4.2. Eigenwirkungen von Picrotoxin

Die Applikation von Picrotoxin in der Nährlösung führte schon mit einer Konzentration von 5×10^{-4} M zu spontanen Depolarisationen des Membranpotentials, während erst bei Konzentrationen von 10^{-3} bis 5×10^{-3} M wesentliche Veränderungen der postsynaptischen Potentiale beobachtet werden konnten. In der Abb. 10 sind entsprechende Ergebnisse zusammengefaßt: Etwa 10 Minuten nach Beginn der Picrotoxinapplikation (5×10^{-3} M) vergrößerten

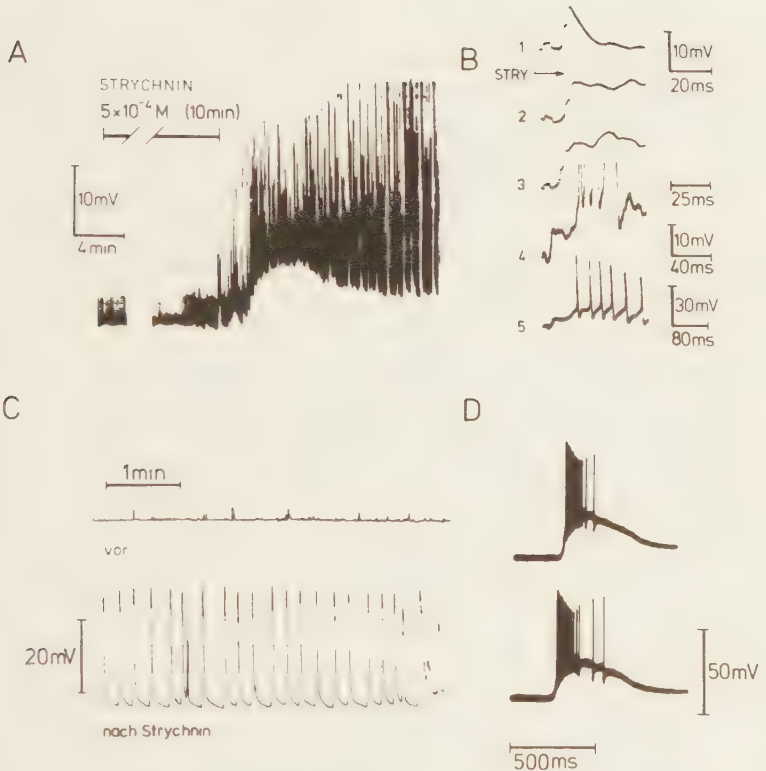


Abb. 9: Wirkungen von Strychnin auf das Membranpotential und die postsynaptischen Potentiale

- A: Registrierung des Membranpotentials mit überlagerten PSP.
- B: Veränderungen des PSP während Strychnin: 1 Kontrolle, 2-5 PSP nach Strychnin bei verschiedener Zeitachse und Verstärkung am Oszillograph.
- C: Zeigt bei einem anderen Experiment die Registrierung des Membranpotentials ohne PSP vor und nach Strychnin (5×10^{-4} M/10 min).
- D: Hier sind 2 der spontanen Depolarisationen von C mit einer schnellen Zeitachse vom Oszillograph ab fotografiert worden.

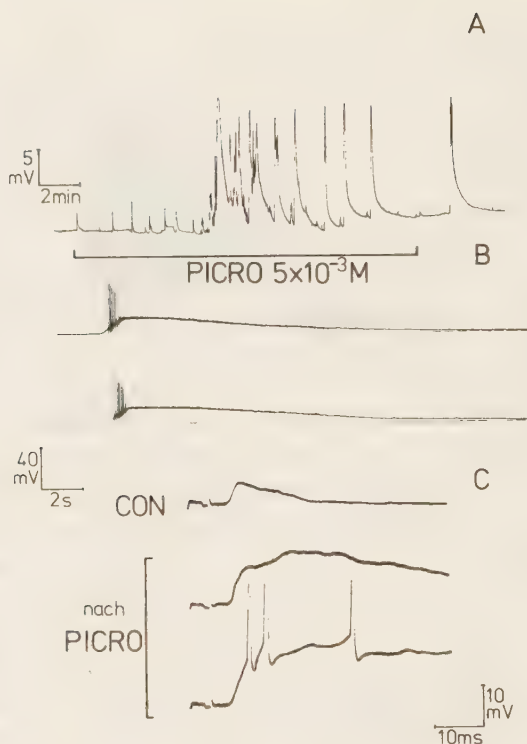


Abb. 10: Wirkungen von Picrotoxin auf das Membranpotential und die postsynaptischen Potentiale (PSP)

- A: Registrierung des Membranpotentials ohne PSP während einer Picrotoxin-Applikation
- B: Hier sind 2 der spontanen Depolarisationen von A vom Oszillograph abfotografiert worden.
- C: Zeigt die Veränderung des PSP nach Picrotoxin (5×10^{-3} M/15 min); CON=Kontroll-PSP (diese Beobachtung stammt von einem anderen Experiment als bei A).

sich die auch unter normalen Bedingungen auftretenden spontanen Membranpotentialdepolarisationen beträchtlich; sie zeigten eine sehr unregelmäßige Frequenz, hatten eine Amplitude von etwa 15 mV und dauerten 20-30 Sekunden (Abb. 10A). Die schnelle Zeitschreibung des Oszillographen macht deutlich, daß in der Anfangsphase jeweils einer dieser spontanen Polarisierungen mehrere Aktionspotentiale an dem Motoneuron ausgelöst wurden (Abb. 10B). Nach Absetzen der Picrotoxingabe hielten diese spontanen Depolarisationen noch etwa 1 bis 2 Stunden lang an. Die relativ lange Dauer von 20-30 Sekunden und die unregelmäßige Häufigkeit des Auftretens zeigt einen Unterschied zu den Strychnin-induzierten Membranpotentialdepolarisationen, deren Dauer kürzer war (500 ms) und die in regelmäßiger und höherer Frequenz auftraten (siehe Abb. 9C,D). Bei allen Picrotoxin-Experimenten veränderten sich die PSP von einer Konzentration von 10^{-3} M an in folgender Weise: Die Amplitude des Anfangsteiles des PSP wurde größer und die Zeitdauer des Signales länger. Außerdem führte das veränderte PSP zur Auslösung einiger Aktionspotentiale an dem Neuron; das erste Aktionspotential entstand dabei gleich in der Anfangsphase des PSP (Abb. 10C). Während Strychnin in erster Linie Veränderungen in dem späteren Verlauf des PSP hervorrief (siehe Abb. 9B), verursachte Picrotoxin im Gegensatz dazu eine Vergrößerung der Amplitude in dem Anfangsteil des postsynaptischen Potentials. Die Picrotoxinwirkung war im allgemeinen nach etwa 2 Stunden Auswaschen mit Ringer-Lösung abgeklungen und es stellten sich wieder normale Verhältnisse ein.

4.3. Wirkungen der Aminosäuren bei gleichzeitiger Gabe von Strychnin

Nach Strychninapplikationen zeigte sich, daß die Effekte von Taurin, β -Alanin, α -Alanin und Glycin vollkommen blockiert oder abgeschwächt waren, während die Applikation von GABA noch zu einer hemmenden Wirkung an den Motoneuronen führte. In Abb. 11 sind als Beispiel die Wirkungen von β -Alanin, GABA und Glycin

vor und nach Strychnin dargestellt: Nach einer Kontrollregistrierung (oberste Reihe) wurden die Aminosäuren 53 Minuten nach dem Ende einer kurzdauernden Strychnineinwirkung (5×10^{-4} M/10 Min.) erneut appliziert. Die postsynaptischen Potentiale, die jetzt durch Strychnin in der oben beschriebenen Weise verändert waren, wurden durch β -Alanin und Glycin in einer Konzentration von 8×10^{-3} M nicht geändert, während GABA (8×10^{-3} M) die Aktionspotentialausbildung verhinderte und die Amplitude des PSP verkleinerte (Abb. 11, mittlere und untere Reihe). Bei einer zweiten β -Alanin-Applikation 85 Minuten nach dem Absetzen von Strychnin konnte allerdings eine Verminderung der Aktionspotentialanzahl des PSP durch diese Aminosäure beobachtet werden (Abb. 11, rechts in der unteren Reihe).

Auch ohne elektrische Erregung der Hinterwurzeln konnten während einer Strychnineinwirkung spontane, kurzdauernde Depolarisationen des Membranpotentials an den Motoneuronen beobachtet werden (siehe Ergebnisteil 4.1.). Wurden die Aminosäuren während des Auftretens solcher Veränderungen in der Ringer-Lösung appliziert, so zeigte nur GABA einen inhibitorischen Effekt, während die anderen Aminosäuren wirkungslos blieben. Zum Beispiel konnte GABA (8×10^{-3} M) 140 Minuten nach Strychnin (5×10^{-4} M/10 Min.) die Anzahl und die Amplitude der spontanen Polarisationen verringern, während Taurin (10^{-3} M) und Glycin (8×10^{-3} M) keine Veränderungen hervorriefen (Abb. 12). Die Wirkung von α -Alanin in einer Konzentration von 8×10^{-3} M wurde durch Strychnin ebenfalls vollständig blockiert (nicht abgebildet).

4.4. Quantitative Untersuchungen der Strychnin-Blockierung

Die Möglichkeit, mit der Applikation in der Nährlösung Strychnin und die Aminosäuren in reproduzierbarer Dosis einwirken zu lassen, wurde angewandt, um die Blockierung der Aminosäurewirkungen nach quantitativen Gesichtspunkten zu untersuchen. Deshalb wurden in einer Reihe von Experimenten nach Strychninein-

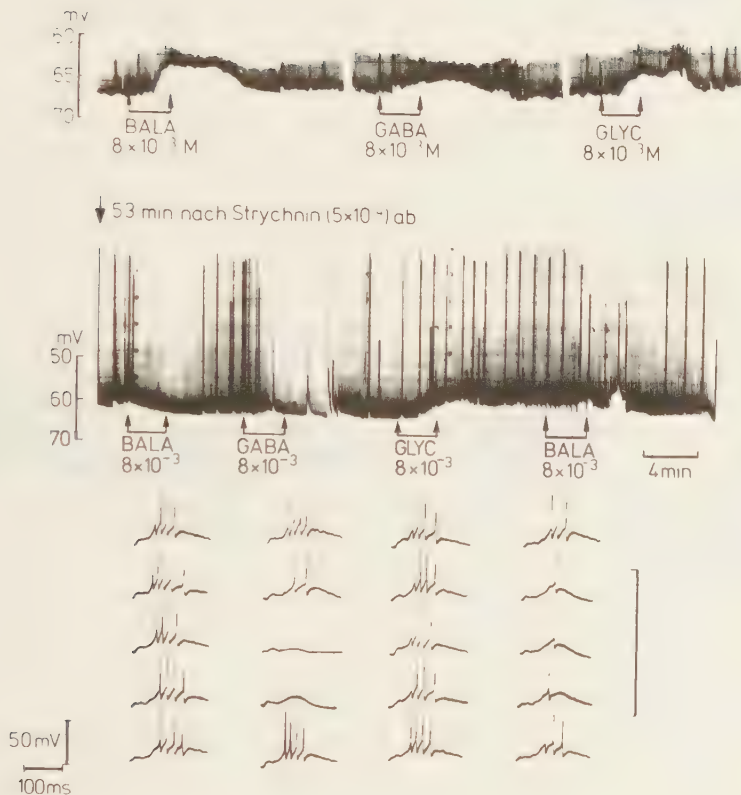


Abb. 11: Die Wirkungen von β -Alanin, GABA und Glycin nach Strychnin

Die oberste Reihe zeigt die Kontrollapplikation von β -Alanin (BALA), GABA und Glycin auf das Membranpotential und die überlagerten PSP. In der mittleren Reihe sind die Wirkungen der Aminosäuren an dem gleichen Motoneuron 53 Minuten nach Strychnin abgebildet. Darunter sind entsprechend zu jeder Aminosäuren-Aktion die Effekte auf einzelne PSP aufgetragen.

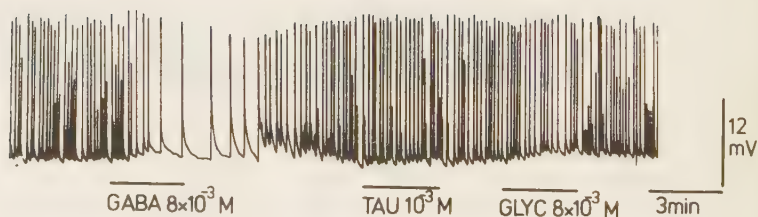


Abb. 12: Wirkungen von GABA, Taurin und Glycin auf die spontanen Membranpotentialdepolarisationen nach Strychnin

Nur GABA verringert die Frequenz und die Amplitude der spontanen Membranpotentialdepolarisationen, die nach einer Strychnin-Applikation (5×10^{-4} M/10 min) beobachtet werden konnten.

wirkung in einer Konzentration von 5×10^{-4} M die Aminosäurekonzentrationen bis auf 2×10^{-2} M erhöht und bei einer anderen Untersuchungsserie Strychnin in einer Konzentration von 10^{-6} M gegeben und die Aminosäuren mit 10^{-3} M (bei Taurin) bzw. 8×10^{-3} M (bei Glycin, α -Alanin und β -Alanin) appliziert. Dabei zeigten sich Unterschiede in der Strychninempfindlichkeit. Die Ergebnisse sind in der Abb. 13 zusammengefaßt. Wurden nach einer Strychnineinwirkung mit einer Konzentration von 5×10^{-4} M für 10 Minuten die Aminosäuren in ihrer Konzentration auf 2×10^{-2} M erhöht, so konnte beobachtet werden, daß β -Alanin, Glycin und α -Alanin die Aktionspotentialausbildung und die Amplitude der PSP verringerten, während Taurin auch bei dieser Konzentration vollkommen in der Wirkung blockiert blieb (Abb. 13A, B). Erst bei einer weiteren Erhöhung der Taurin-Konzentration auf $2,5 \times 10^{-2}$ M wurde ein geringer hemmender Effekt dieser Aminosäure sichtbar (nicht abgebildet). Auch mit einer niedrigen Konzentration von Strychnin (10^{-6} M) war die Wirkung von Taurin (10^{-3} M) vollkommen blockiert, sobald die für Strychnin typischen Veränderungen der postsynaptischen Potentiale erschienen. Zu diesem Zeitpunkt waren aber Glycin und β -Alanin (beide 8×10^{-3} M) noch fähig, eine Hemmung zu verursachen (Abb. 13C). Diese Ergebnisse weisen auf eine besondere Empfindlichkeit der Taurinwirkung gegenüber Strychnin im Vergleich mit den anderen Aminosäuren hin.

4.5. Wirkungen der Aminosäuren bei gleichzeitiger Gabe von Picrotoxin

Die Einwirkung der Aminosäuren nach einer Picrotoxinapplikation zeigte insgesamt, daß die Wirkung von GABA ganz blockiert oder abgeschwächt war, während die Effekte von α -Alanin, β -Alanin, Glycin und Taurin nicht beeinflußt wurden. Als Beispiel sind in der Abb. 14 die Wirkungen von Glycin, GABA und β -Alanin vor und nach Picrotoxin abgebildet: Nach einer Kontrollapplikation der Aminosäuren (8×10^{-3} M) wurde Picrotoxin in einer Konzentration von 5×10^{-4} M für 20 Minuten in das Bad eingeleitet.

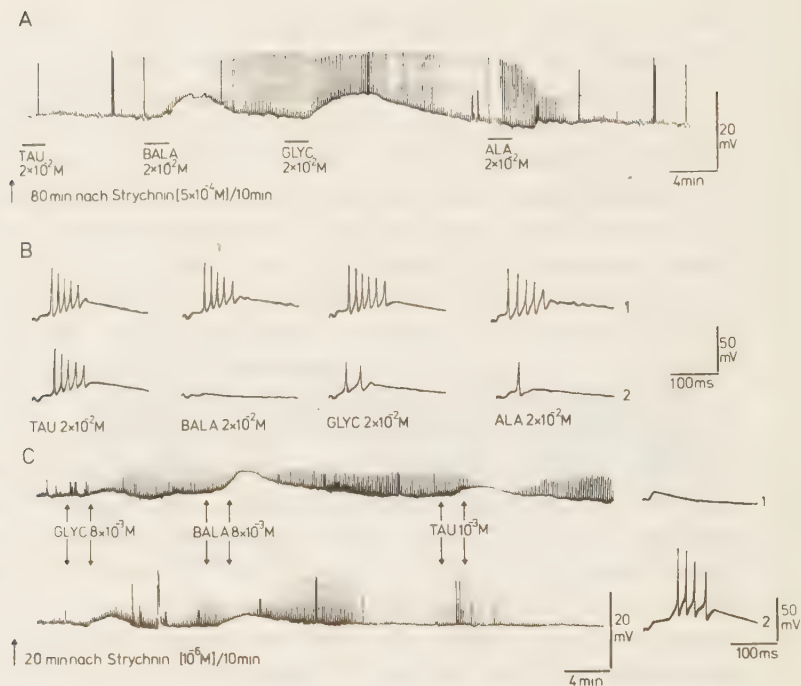


Abb. 13: Quantitative Untersuchung der Strychnin-Blockierung

- A: Zeigt die Wirkungen der Aminosäuren mit hoher Konzentration (2×10^{-2} M) 80 Minuten nach Strychnin (5×10^{-4} M/10 min).
- B: Entsprechend zu A sind hier die PSP vor (1) und während des maximalen Aminosäuren-Effektes (2) aufgetragen.
- C: Die obere Reihe zeigt bei einem anderen Versuch die Kontrollapplikation von Glycin, β -Alanin (BALA) und Taurin. In der unteren Reihe ist die wiederholte Applikation der Aminosäuren nach einer Strychnineinwirkung (10^{-6} M/10 min) abgebildet. Rechts sind zwei einzelne PSP vor (1) und nach (2) der Strychninapplikation aufgetragen.

Etwa 16 Minuten nach dem Beginn der Picrotoxineinwirkung trat zum erstenmal eine spontane Membranpotentialdepolarisation auf, nach der die Aminosäuren erneut appliziert wurden (Abb. 14B). Obwohl die Wirkungen von GABA und β -Alanin von spontanen Depolarisationen unterbrochen sind, ist doch klar ersichtlich, daß Glycin und β -Alanin wie bei der Kontrolle (Abb. 14A) eine Membrandepolarisation und eine Amplitudenverringering der PSP bewirken, während der GABA-Effekt blockiert ist. Bei anderen Experimenten konnte beobachtet werden, daß auch die Wirkungen von Taurin und α -Alanin wie Glycin und β -Alanin durch Picrotoxin nicht abgeschwächt wurden (nicht abgebildet). Jedoch führte Picrotoxin im Gegensatz zur Abb. 14 oft nur zu einer Verringerung der GABA-Wirkung, nicht zu einer vollständigen Blockierung, auch bei einer Erhöhung der Picrotoxinkonzentration bis auf 5×10^{-3} M.

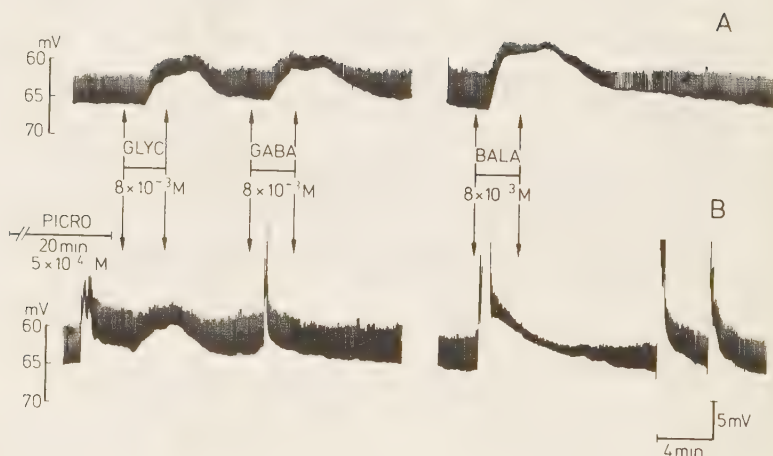


Abb. 14: Die Wirkungen von Glycin, GABA und β -Alanin nach Picrotoxin

- A: Kontrollapplikation der Aminosäuren auf das Membranpotential und die PSP.
- B: Wiederholte Einwirkung der Aminosäuren an dem gleichen Motoneuron 20 Minuten nach Picrotoxin (5×10^{-4} M/20 min).

D DISKUSSION

1. Diskussion der postsynaptischen Wirkung

Extrazelluläre Messungen am isolierten Rückenmark des Frosches haben ergeben, daß γ -Aminobuttersäure (GABA) und einige chemisch verwandte Aminosäuren die Erregbarkeit der Motoneurone hemmen können (CURTIS, PHILLIS und WATKINS 1961; TÉBÉCIS und PHILLIS 1969; BARKER und NICOLL 1973). Intrazelluläre Ableitungen erlauben es, die Wirkungen der Aminosäuren auf das Membranpotential, die Membranleitfähigkeit, die postsynaptischen Potentiale und auf Aktionspotentiale zu beobachten und damit Aussagen über den möglichen Wirkungsmechanismus zu treffen. Weiterhin lassen sich die Veränderungen, die durch die Aminosäuren verursacht wurden, mit der natürlichen postsynaptischen Inhibition vergleichen. Dabei kann das Kriterium der physiologischen und pharmakologischen Identität überprüft werden (siehe Einleitung). Nach der gängigen Vorstellung entsteht ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) an einer Nervenzelle, wenn die entsprechenden Rezeptoren der postsynaptischen Membran nach einer synaptischen Erregung durch präsynaptisch freigesetzte Transmittermoleküle aktiviert werden. Als Folge kommt es zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität in erster Linie für Chloridionen (COOMBS, ECCLES und FATT 1955; LUX 1971; LLINAS und BAKER 1972; OZAWA und TSUDA 1973) und zu einer dadurch hervorgerufenen Veränderung des Membranpotentials mit einem Umkehrpotential in der Nähe des Ruhemembranpotentialwertes (Übersicht bei ECCLES 1964).

Entsprechende Beobachtungen sind hier für die Motoneurone des isolierten Froschrückenmarkes nach Einwirkung der Aminosäuren beschrieben worden. Taurin, β -Alanin, α -Alanin, GABA und Glycin erhöhten die Membranleitfähigkeit und führten zu einer Veränderung des Ruhemembranpotentials. Die Membranleitfähigkeitsmessungen (vgl. Abb. 5) erlauben allerdings nicht die Aussage, für welche spezielle Art von Ionen sich der Widerstand der Mem-

bran verminderte. Untersuchungen an spinalen Neuronen der Katze haben ergeben, daß die Wirkung von Glycin und entsprechend die synaptische Inhibition auf eine intrazelluläre Injektion von Chlorid-, Bromid- und Jodidionen reagierten (WERMAN et al. 1968), während die intrazelluläre Applikation von Bromat-, Sulfat- und Citrationen keinen Einfluß hatte (CURTIS et al. 1968 b). So konnten diese Beobachtungen für das Rückenmark der Katze eine gute Übereinstimmung in der ionalen Abhängigkeit der Aminosäurewirkung und dem IPSP zeigen. Die Veränderung des Membranpotentials der Frosch-Motoneurone durch die Aminosäuren entsprach immer der Polarisationsrichtung des IPSP (siehe Abb. 4), so daß daher auch beim Frosch auf ein ähnliches Umkehrpotential der Aminosäurewirkung und des IPSP geschlossen werden kann. Eine genaue Untersuchung dieser Fragestellung an spinalen Neuronen der Katze hat gezeigt, daß tatsächlich die Glycin-Wirkung ein der synaptischen Inhibition entsprechendes Umkehrpotential besitzt (WERMAN et al. 1968; CURTIS et al. 1968 b; ten BRUGGEN-CATE und ENGBERG 1968). Die Übereinstimmung in der Veränderung der Membranleitfähigkeit und des Membranpotentials durch die natürliche postsynaptische Inhibition und durch die Wirkung der Transmitterkandidaten zeigt, daß das Kriterium der physiologischen Identität für Taurin, β -Alanin, α -Alanin, GABA und Glycin an den Motoneuronen des Frosch-Rückenmarkes erfüllt ist.

Unter dem Einfluß der Aminosäuren kam es auch zu einer Blockierung des antidromen Aktionspotentials und zu einer Verkleinerung der postsynaptischen Potentiale. Die Hemmung in der Auslösung des antidromen Aktionspotentials kann durch folgende Annahme erklärt werden: Durch die Einwirkung der Aminosäuren erhöht sich die Leitfähigkeit am Soma des Motoneurons; dies führt zu einer Blockierung der Überleitung des antidromen Aktionspotentials vom Initialsegment auf die Soma- und Dendritenmembran, so daß während des maximalen Effektes das SD-Segment des Aktionspotentials blockiert und die Amplitude des IS-Segmentanteiles sogar verringert ist (siehe Abb. 6; WERMAN, DAVIDOFF und APRISON 1968). Die Verkleinerung der Amplitude des

postsynaptischen Potentiales ist schwieriger zu analysieren, weil die elektrische Erregung der Hinterwurzeln ein gemischtes postsynaptisches Potential hervorruft und EPSP und IPSP nicht in reiner Form auslösbar waren. WERMAN und seine Mitarbeiter (1968) haben aufgrund ihrer Beobachtungen mit Glycin folgende Überlegungen diskutiert: Das EPSP wird durch den Leitfähigkeitsanstieg während der aminosäureinduzierten Hemmung verkleinert. Für das IPSP nehmen die Autoren mehrere Gründe für die Verringerung der Amplitude an. Einmal wird durch die künstlich zugeführten Glycin-Moleküle der Widerstand der Membran erniedrigt, so daß die durch synaptische Reizung freigesetzten Transmittermoleküle keine wesentliche Leitfähigkeitserhöhung mehr bewirken können. Zweitens wird das Membranpotential durch die Glycineinwirkung in Richtung auf das Gleichgewichtspotential der Chloridionen verschoben; dies verringert die Amplitude des IPSP, das den gleichen Potentialwert anstrebt. Drittens vermuteten WERMAN und seine Mitarbeiter, daß die zugeführte Aminosäure Rezeptoren, an denen auch der natürliche inhibitorische Transmitter wirken kann, besetzt und damit die Einwirkung dieser Überträgermoleküle verhindert. Auch die beschriebene Verkleinerung der Amplitude des postsynaptischen Potentiales durch die Einwirkung von Taurin, β -Alanin, α -Alanin, GABA und Glycin an den Motoneuronen des Frosch-Rückenmarkes läßt sich durch diese Überlegungen erklären.

Eine zusätzliche Wirkung der Aminosäuren an Strukturen der natürlichen präsynaptischen Hemmung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, weil die diffundierenden Moleküle bei der Applikation in der Nährlösung vermutlich alle Regionen des Rückenmarkes erreichen werden. Aber mit der Technik der intrazellulären Ableitung läßt sich neben dem postsynaptischen Wirkort eine zusätzliche Wirkung von GABA, β -Alanin oder Taurin an Rezeptoren der präsynaptischen Hemmung, wie von vielen Untersuchern vermutet wurde (SCHMIDT 1963; TÉBÉCIS und PHILLIS; DAVIDOFF 1972 a, b; BARKER und NICOLL 1973; NICOLL und BARKER 1973), nicht beurteilen.

2. Überlegungen zur funktionellen Bedeutung der verschiedenen Aminosäuren

Alle untersuchten Aminosäuren zeigten gleiche Wirkungen auf das Membranpotential, die postsynaptischen Potentiale und die Membranleitfähigkeit. Trotz dieser ähnlichen Effekte soll mit den folgenden Überlegungen versucht werden, auf Unterschiede zwischen Taurin, β -Alanin, α -Alanin, GABA und Glycin in der Bedeutung als mögliche Transmitter hinzuweisen. Dabei helfen Beobachtungen über die relative Wirkstärke, Angaben über neurochemische Befunde und Untersuchungen mit Picrotoxin und Strychnin weiter.

2.1. Relative Wirkstärke

Bei der Applikation in die Nährlösung verursachte Taurin weit- aus die stärkste Hemmung, gefolgt von β -Alanin, α -Alanin, GABA und Glycin. Diese intrazellulär gewonnenen Ergebnisse legen einen Vergleich mit den extrazellulären Untersuchungen am Frosch-Rückenmark (CURTIS et al. 1961; FUKUYA 1961) nahe. CURTIS und seine Mitarbeiter beschrieben anhand der Verkleinerung des Vorderwurzelreflexes GABA, β -Alanin und Taurin als etwa gleich stark wirksam und bewerteten Glycin aber als deutlich schwächer wirksam. FUKUYA (1961) untersuchte den Effekt der Aminosäuren nicht am isolierten Rückenmark, sondern durchspülte den Rückenmarkskanal in situ. Anhand der Verringerung von Reflexaktivität beurteilte er den GABA-Effekt als stärksten, gefolgt von β -Alanin und Glycin, welches nur ganz schwach wirksam war. Über Taurin machte er keine Angaben. Die relativen Wirkstärken von GABA und β -Alanin und die schwache Glycin-Hemmung bei diesen extrazellulären Arbeiten stehen in Übereinstimmung mit den intrazellulär gewonnenen Ergebnissen. Die Wirkstärke von Taurin, die bei CURTIS et al. (1961) nur der von GABA und β -Alanin entsprach, zeigt aber einen Unterschied, da intrazellulär gemessen der Effekt von Taurin immer wesentlich stärker als der von β -Alanin und GABA war.

Zur Beurteilung der relativen Wirkstärke diene eine gleich starke Konzentration der Aminosäuren in der Nährlösung. Gleiche Konzentrationen in der Nährlösung bedeuten jedoch nicht sicher auch gleiche Konzentration an der Motoneuronenmembran. Enzymatischer Abbau und zelluläre Aufnahme (CURTIS, DUGGAN und JOHNSTON 1970) erzeugen möglicherweise einen Konzentrationsgradienten entlang der Diffusionsstrecke zu den Motoneuronen, die in Tiefen zwischen 100 und 200 μm (SILVER 1942) zu finden sind. Jedoch ist nichts bekannt über die Wirksamkeit solcher Abbaumechanismen, und damit läßt sich weder der Konzentrationsgradient noch die Konzentration der Aminosäuren an den Rezeptoren der Motoneurone abschätzen. Unterschiede in der Aktivität des enzymatischen Abbaues oder der zellulären Aufnahme der verschiedenen Aminosäuren würden aber bedeuten, daß unterschiedlich große Mengen der Aminosäuren an der Motoneuronenmembran einwirken könnten. Dies wäre dann eine mögliche Erklärung für die verschiedene relative Wirkstärke. Bei der Technik der Iontophorese beträgt der Diffusionsweg zu den Motoneuronen aber nur etwa 20-40 μm und Unterschiede in der Aktivität der Abbaumechanismen zwischen den verschiedenen Aminosäuren könnten sich im Vergleich zu dem wesentlich längeren Weg von der Oberfläche nicht so stark bemerkbar machen. Mit dieser Technik würde man dann erheblich geringere Unterschiede in der relativen Wirkstärke erwarten. Aber auch bei der Iontophorese zeigten GABA, Glycin und β -Alanin verglichen mit der Applikation in der Nährlösung die gleiche Wirkstärkerelation. Taurin und α -Alanin wurden bei diesen Experimenten nicht untersucht. So ist anzunehmen, daß die Aminosäuren trotz gleicher Konzentration an der Motoneuronenmembran unterschiedlich wirksam sind. Diese Beobachtung wäre dann möglicherweise als verschieden starke Affinität der Aminosäuren zu den Rezeptoren des natürlichen inhibitorischen Transmitters zu deuten. Andererseits ließen sich diese Ergebnisse auch durch eine unterschiedliche Anzahl von spezifisch empfindlichen Rezeptoren an der Membran ableiten. So könnte eine größere Menge von Taurin-empfindlichen Rezeptoren im Vergleich zu wenigen Glycin-empfindlichen Rezeptoren die unterschiedliche

Wirkstärke dieser beiden Aminosäuren erklären.

2.2. Neurochemische Befunde

Chemische Analysen über den Gehalt an freien Aminosäuren im Rückenmark des Frosches gibt es nur wenige (APRISON, SHANK und DAVIDOFF 1969; COLLINS 1974). APRISON und seine Mitarbeiter haben den Gehalt an freiem Glycin an sechs verschiedenen Wirbeltieren verglichen. Nach ihren Untersuchungen am Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) ist Glycin dort in den Lumbalsegmenten vorhanden, und zwar in einer Menge von $3,90 \mu\text{Mol/g}$ Gewebe. COLLINS (1974) hat den Gehalt von verschiedenen freien Aminosäuren im gesamten Rückenmark des Frosches (*Rana pipiens*) verglichen. Seine Konzentrationsangaben sind für alle Aminosäuren jedoch geringer als die Werte von APRISON et al. (1969). Die Menge von Glycin bestimmte er als $1,04 \mu\text{Mol/g}$ Gewebe. GABA mit $1,84 \mu\text{Mol/g}$ und besonders Taurin mit einem Gehalt von $2,29 \mu\text{Mol/g}$ sind jedoch in höheren Konzentrationen vorhanden. α -Alanin kommt nur in ganz geringen Mengen vor ($0,25 \mu\text{Mol/g}$) und über β -Alanin sind keine Angaben über den Gehalt im Rückenmark des Frosches vorhanden. Vom Rückenmark der Katze ist jedoch bekannt, daß β -Alanin eine Konzentration von $0,01 \mu\text{Mol/g}$ nicht überschreitet (JOHNSTON 1968). Die nur geringen nachweisbaren Mengen von α -Alanin und β -Alanin stehen im Widerspruch zu der relativ starken elektrophysiologischen Wirkung und könnten gegen eine Bedeutung als Transmitter sprechen. Es wäre jedoch möglich, daß ein besonders hoher Stoffwechselumsatz dieser beiden Aminosäuren vorliegt und sie deshalb in nur geringen Mengen nachweisbar sind. Für alle Aminosäuren gilt, daß neben dem neurochemischen Nachweis die Verteilung im Rückenmark genauer untersucht werden müßte. Eine höhere Konzentration der Aminosäuren in der grauen Substanz, also in der Region der Synapsen und der Zellkörper, verglichen mit der weißen Substanz, könnte die mögliche Bedeutung als Transmitter unterstützen (GRAHAM et al. 1967; JOHNSTON 1968; APRISON, SHANK und DAVIDOFF 1969).

2.3. Picrotoxin und Strychnin

Picrotoxin und Strychnin sind Substanzen, die neben der Blockierung physiologischer Hemmvorgänge zur pharmakologischen Unterscheidung der Wirkungen verschiedener Aminosäuren herangezogen werden können (siehe Einleitung). Die Veränderungen der postsynaptischen Potentiale der Motoneurone des Frosch-Rückenmarkes nach Picrotoxin- und Strychninapplikationen sind jedoch vergleichsweise schwierig zu beurteilen. Einmal verursachte die elektrische Erregung der Hinterwurzeln ein gemischtes, aus excitatorischen und inhibitorischen Anteilen bestehendes postsynaptisches Potential (siehe Abb. 2). Zusätzlich änderte sich die Polarisationsrichtung des IPSP kurz nach dem Einstich in die Zelle von einer Hyperpolarisation in eine Depolarisation (siehe Abb. 2; KATZ und MILEDI 1963), so daß die Beeinflussung des IPSP durch Picrotoxin und Strychnin schwer zu beurteilen ist. Jedoch war auffällig, daß Picrotoxin den frühen Anteil des postsynaptischen Potentials veränderte, während die Strychnineinwirkung in erster Linie die späte Phase des PSP beeinflusste (siehe Abb. 9 und 10 und Ergebnisteil). Diese Unterschiede in der Veränderung des PSP sind ein Hinweis, daß Strychnin und Picrotoxin unterschiedliche natürliche hemmende Mechanismen blockieren können.

In Übereinstimmung mit Messungen an spinalen Neuronen der Katze (DAVIDOFF und APRISON 1969; CURTIS, DUGGAN und JOHNSTON 1969; ENGBERG und THALLER 1970) und extrazellulären Untersuchungen am Frosch-Rückenmark (FUKUYA 1961; TÉBÉCIS und PHILLIS 1969; BARKER und NICOLL 1973) kann Picrotoxin die postsynaptische Wirkung von GABA an spinalen Motoneuronen des Frosches unterdrücken. Die Wirkungen von Taurin, α -Alanin, β -Alanin und Glycin waren auch nach Einwirkung von Picrotoxin in hoher Konzentration (5×10^{-3} M) nicht gehemmt. In vielen Fällen jedoch veränderte Picrotoxin auffällig die postsynaptischen Potentiale, während der GABA-Effekt nur abgeschwächt, nicht aber blockiert wurde. Deshalb kann Picrotoxin in Übereinstimmung mit HILL, SIMMONDS und STRAUGHAN (1973) zwar als spezifischer, aber schwa-

cher Antagonist der Wirkung von GABA betrachtet werden. Ebenfalls in Übereinstimmung mit Messungen an spinalen Neuronen der Katze (CURTIS et al. 1968 a, b und 1971; LARSON 1969; DAVIDOFF, APRISON und WERMAN 1969; de GROAT 1970) und extrazellulären Untersuchungen am Frosch-Rückenmark (TÉBÉCIS und PHILLIS 1969) konnte Strychnin die postsynaptische Wirkung von Taurin, α -Alanin, β -Alanin und Glycin an spinalen Motoneuronen des Frosches unterdrücken, hemmte aber den GABA-Effekt nicht. Bei einem Vergleich dieser Aminosäuren zeigte es sich aber, daß sie unterschiedlich empfindlich durch Strychnin blockierbar waren (siehe Abb. 13). Die große Empfindlichkeit der Taurinwirkung gegenüber Strychnin ist möglicherweise ein Hinweis auf eine besondere Bedeutung von Taurin als Transmitter einer Strychnin-blockierbaren Hemmung (s. Diskussion, Teil 2.4.).

2.4. Folgerungen

Zusammengefaßt lassen die Beobachtungen mit GABA folgende Schlüsse auf die Bedeutung dieser Aminosäure im Rückenmark des Frosches zu: Chemische Analysen haben gezeigt, daß GABA im Rückenmark des Frosches nachweisbar ist (COLLINS 1974). Die Einwirkung dieser Aminosäure führte zu einer postsynaptischen Hemmung an Motoneuronen, die das Kriterium der physiologischen Identität (siehe Diskussion, Teil 1) erfüllte. Weiterhin wurde GABA durch Picrotoxin in der Wirkung abgeschwächt. Da unter Picrotoxin auch natürliche Hemmvorgänge unterdrückt werden, ist es sehr wahrscheinlich, daß GABA eine Bedeutung als Transmitter einer durch Picrotoxin blockierbaren postsynaptischen Hemmung an Motoneuronen des Frosch-Rückenmarkes zukommt.

Für eine Bedeutung von Taurin als Transmitter einer durch Strychnin blockierbaren postsynaptischen Hemmung spricht die große Empfindlichkeit der Taurinwirkung gegenüber Strychnin. Dies unterscheidet Taurin von den ebenfalls Strychnin-empfindlichen Aminosäuren Glycin, α -Alanin und β -Alanin. Unterstützt wird diese Aussage durch die starke hemmende Wirkung von Taurin im Vergleich

zu den anderen Transmitterkandidaten und dem chemischen Nachweis im Rückenmark des Frosches (COLLINS 1974).

Für eine Funktion von Glycin als Transmitter lassen sich neben der postsynaptisch hemmenden Wirkung die hohe Konzentration dieser Aminosäure im Frosch-Rückenmark anführen (APRISON et al. 1969; COLLINS 1974). Dagegen spricht möglicherweise die relativ schwache Wirkstärke und die geringere Empfindlichkeit gegenüber Strychnin. Denn sobald durch Strychnin natürliche Hemmvorgänge blockiert waren, erschien auch die Taurinwirkung gänzlich unterdrückt; im Gegensatz dazu verursachte Glycin aber noch eine deutliche Hemmung (siehe Ergebnisse, Teil 4.4.). Jedoch erlaubt dieser Befund allein eine Ablehnung von Glycin als möglichen Transmitter nicht, besonders auch im Hinblick auf die vielen Hinweise für eine Funktion dieser Aminosäure als Neurotransmitter im Rückenmark der Katze (s. Diskussion, Teil 3.).

Gegen eine Bedeutung von α -Alanin und β -Alanin lassen sich neben der gleichfalls geringen Strychnin-Empfindlichkeit die nur minimalen Konzentrationen im Rückenmark (COLLINS 1974; JOHNSTON 1968) anführen. Jedoch könnte ein besonders hoher Stoffwechselumsatz dieser beiden Aminosäuren vorliegen und auch die relativ große Wirkstärke läßt eine Funktion als Neurotransmitter nicht sicher ausschließen.

3. Vergleich mit Untersuchungen am Rückenmark der Katze

Die umfangreichen Untersuchungen von Aminosäuren mit hemmender Wirkung an Rückenmarksneuronen der Katze erlauben einen Vergleich zu den Beobachtungen am Rückenmark des Frosches. Sowohl die relativen Wirkstärken, als auch die Konzentrationen der verschiedenen Aminosäuren im Nervengewebe sind unterschiedlich zwischen den beiden Wirbeltieren. CURTIS, HÜSLI und JOHNSTON (1968a) beschrieben die relative Wirkstärke an spinalen Motoneuronen und Interneuronen der Katze wie folgt: Glycin führte zu der stärksten Hemmung, dann folgten mit der ungefähr gleichen Wirkstärke β -Alanin und GABA, und Taurin war immer schwächer als Glycin

und GABA. Die starke Wirkung von Glycin und der relativ schwache Effekt von Taurin stehen im Gegensatz zu den intrazellulären und auch zu den extrazellulären (FUKUYA 1961; CURTIS et al. 1961) Beobachtungen am Rückenmark des Frosches. Die Angaben über die relative Wirkstärke an spinalen Neuronen der Katze sind mit Hilfe der Iontophorese erarbeitet worden, die Messungen am Frosch wurden jedoch mit der Badapplikation durchgeführt. Aber auch die iontophoretische Einwirkung von Glycin, GABA und β -Alanin auf spinale Motoneurone des Frosches hat gezeigt, daß im Gegensatz zur Katze Glycin die relativ schwächste Hemmwirkung zeigte (siehe Abb. 7). Auch bei den Konzentrationen der verschiedenen Aminosäuren im Rückenmark zeigen sich Unterschiede zwischen der Katze und dem Frosch. Freies Glycin ist in der grauen Substanz des Rückenmarkes der Katze in der hohen Konzentration von $6,0 \mu\text{Mol/g}$ Gewebe nachweisbar, GABA in einer Konzentration von $1,6 \mu\text{Mol/g}$ und auch α -Alanin mit $1,3 \mu\text{Mol/g}$ ist in relativ großer Menge nachweisbar. Taurin konnte aber nur in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{Mol/g}$ Gewebe aufgefunden werden (GRAHAM, SHANK, WERMAN und APRISON 1967; JOHNSTON 1968). Die große Menge von freiem Glycin und die nur sehr geringe Konzentration von Taurin stehen im Gegensatz zu den Messungen am Rückenmark des Frosches (s. Diskussion, Teil 2.2.).

Zusammengefaßt wurden die Befunde am Rückenmark der Katze so gedeutet, daß GABA der Transmitter einer durch Picrotoxin blockierbaren Hemmung sein könnte, während als Überträgersubstanz der Strychnin-empfindlichen postsynaptischen Inhibition Glycin eine Bedeutung besitzt (Übersicht bei CURTIS und JOHNSTON 1974). Die Beobachtungen am Rückenmark des Frosches weisen auf eine ähnliche Funktion von GABA auch an diesem Wirbeltier hin. Doch die nur geringe hemmende Wirkstärke und niedrigere Konzentration von Glycin im Frosch-Rückenmark stehen im Gegensatz zu den Befunden am Rückenmark der Katze. Möglicherweise hat Glycin erst während der Phylogenese eine stärkere Bedeutung erlangt, und auf der Entwicklungsstufe des Frosches könnte überwiegend Taurin der Transmitter der Strychnin-empfindlichen postsynapti-

schen Hemmung im Rückenmark sein. Auch an der Mauthner Zelle im Goldfisch, einem Neuron in der Medulla oblongata dieses Tieres, ist eine Strychnin-sensitive postsynaptische Inhibition beschrieben worden, für die Glycin aufgrund quantitativer Überlegungen in seiner Blockierbarkeit durch Strychnin als natürlicher Transmitter angezweifelt wurde (ROPER und DIAMOND 1969; DIAMOND, ROPER und YASARGIL 1973). In diesem Zusammenhang sind noch einige neurochemische Untersuchungen erwähnenswert. Es wurde beobachtet, daß im Gehirn neugeborener Ratten Taurin in hohen Konzentrationen vorhanden ist, während es im Gehirn ausgewachsener Ratten bis auf 1/4 dieser Konzentration absinkt (AGRAWAL, DAVISON und KACZMAREK 1971; TIMIRAS, HUDSON und OKLUND 1973). TIMIRAS und Mitarbeiter (1973) wiesen darauf hin, daß dieser Befund der ontogenetischen Wiederholung einer phylogenetischen Entwicklung entspräche.

4. Ausblick

Die Möglichkeiten eines isolierten Präparates könnten in weiteren Experimenten zu einer genaueren Erforschung des Wirkungsmechanismus der Aminosäuren verwendet werden. Relativ einfach ließen sie Änderungen der Temperatur und des pH auf die Aminosäurewirkung untersuchen. Weiterhin könnten Änderungen in der Ionenzusammensetzung der Ringer-Lösung Aufschluß geben über den ionalen Mechanismus des hemmenden Effektes. Auch eine erweiterte Präparation würde eine genauere Analyse, besonders der Strychnin- und Picrotoxineinwirkung erlauben. Durch eine Präparation der Hinterwurzeln über das Ganglion spinale hinaus bis zu den feinen peripheren Nervenästen könnten reine IPSP in den Motoneuronen ausgelöst werden. Damit wäre eine bessere Beurteilung der Blockierung definierter postsynaptischer Inhibition durch die Krampfgifte möglich.

E ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wirkungen der Aminosäuren Glycin, α -Alanin, β -Alanin, γ -Aminobuttersäure (GABA) und Taurin wurden mit Hilfe intrazellulärer Ableitungen an lumbalen Motoneuronen des isolierten Frosch-Rückenmarkes untersucht.

2. Alle verwendeten Aminosäuren führten zu einer Verkleinerung der Amplitude postsynaptischer Potentiale, zu einer Blockierung antidromer Aktionspotentiale und zu einer Membranleitfähigkeitserhöhung. Weiterhin verursachten sie eine Veränderung des Ruhemembranpotentials, deren Richtung mit der des inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) übereinstimmte. Diese Befunde weisen auf eine hemmende, postsynaptische Wirkung der Aminosäuren hin, die in wesentlichen Kennzeichen dem IPSP entsprach.

3. Bei einem Vergleich der relativen Wirkstärke zeigte Taurin die stärksten Effekte gefolgt von β -Alanin, α -Alanin, GABA und Glycin, welches am schwächsten wirkte.

4. Die Einwirkung von Picrotoxin und Strychnin führte zu ausgeprägten Veränderungen der postsynaptischen Potentiale und zu spontanen Depolarisationen des Membranpotentials. Charakteristische Unterschiede der Wirkungen weisen darauf hin, daß durch Picrotoxin und Strychnin unterschiedliche hemmende Mechanismen im Rückenmark blockiert werden. Gleichzeitig wurde durch Picrotoxin selektiv der Effekt von GABA abgeschwächt, während Strychnin die Wirkungen von Taurin, α -Alanin, β -Alanin und Glycin unterdrückte.

5. Quantitative Messungen ergaben, daß die Wirkung von Taurin im Vergleich zu α -Alanin, β -Alanin und Glycin am empfindlichsten durch Strychnin blockiert wurde.

6. In der Diskussion wird die Bedeutung von GABA als Transmitter einer durch Picrotoxin blockierbaren postsynaptischen Hemmung an Motoneuronen des Frosch-Rückenmarkes erörtert. Für die Strychnin-empfindliche postsynaptische Hemmung weisen die Befunde in erster Linie auf eine Bedeutung von Taurin als Transmitter hin.

F LITERATURVERZEICHNIS

- Agrawal, H.C., A.N. Davison und L.K. Kaczmarek:
Subcellular distribution of taurine and cysteinesulphinate decarboxylase in developing rat brain.
Biochem. Journal 122 (1971) 759-763
- Aprison, M.H., R.P. Shank und R.A. Davidoff:
A comparison of the concentration of glycine, a transmitter suspect, in different areas of the brain and spinal cord in seven different vertebrates.
Comp. Biochem. Physiol. 28 (1969) 1345-1355
- Araki, T., T. Otani und T. Furukawa:
The electrical activities of single motoneurons in toad's spinal cord, recorded with intracellular electrodes.
Jap. Journal of Physiol. 3 (1953) 254-267
- Barker, J.L. und R.A. Nicoll:
The pharmacology and ionic dependency of amino acid responses in the frog spinal cord.
Journal of Physiol. 228 (1973) 259-277
- Barron, D.B. und B.H.C. Matthews:
The interpretation of potential changes in the spinal cord.
Journal of Physiol. 92 (1938) 276-321
- Biscoe, T.J., A.W. Duggan und D. Lodge:
Some actions of bicuculline and strychnine on neurones of the spinal cord and cerebral cortex of the rat.
Journal of Physiol. 222 (1972) 141-142P
- Brookhart, J.M., X. Machne und E. Fadiga:
Patterns of motor neuron discharge in the frog.
Arch. Ital. Biol. 97 (1959) 53-67
- Bruggencate, G. ten und I. Engberg:
Analysis of glycine actions on spinal interneurons by intracellular recording.
Brain Research 11 (1968) 446-450
- Castillo, J. del und L. Engbaek:
The nature of the neuromuscular block produced by magnesium.
Journal of Physiol. 124 (1954) 370-384
- Collins, G.G.S.:
The spontaneous and electrically evoked release of (^3H)-GABA from the isolated hemisectioned frog spinal cord.
Brain Research 66 (1974) 121-137

Coombs, J.S., J.C. Eccles und P. Fatt:
The specific ionic conductance and the ionic movements across
the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post-
synaptic potential.

Journal of Physiol. 130 (1955) 326-373

Cruce, W.L.R.:

The anatomical organization of hindlimb motoneurons in the
lumbar spinal cord of the frog, *Rana catesbiana*.

Journal of comp. Neurol. 153 (1974) 59-76

Curtis, D.R.:

Microelectrophoresis. In: Physical techniques in biological
research, Bd. 5, hrsg. von W.L. Nastuk.

Academic Press, New York 144-190 (1964)

Curtis, D.R., A.W. Duggan und G.A.R. Johnston:

Clycine, strychnine, picrotoxin and spinal inhibition.

Brain Research 14 (1969) 759-762

Curtis, D.R., A.W. Duggan und G.A.R. Johnston:

The inactivation of extracellular administered amino acids
in the feline spinal cord.

Exp. Brain Research 10 (1970) 447-462

Curtis, D.R., A.W. Duggan und G.A.R. Johnston:

The specificity of strychnine as a glycine antagonist in the
mammalian spinal cord.

Exp. Brain Research 12 (1971) 547-565

Curtis, D.R., L. Hösli und G.A.R. Johnston:

A pharmacological study of the depression of spinal neurones
by glycine and related amino acids.

Exp. Brain Research 6 (1968a) 1-18

Curtis, D.R., L. Hösli, G.A.R. Johnston und I.H. Johnston:

The hyperpolarization of spinal motoneurones by glycine and
related amino acids.

Exp. Brain Research 5 (1968b) 235-258

Curtis, D.R. und G.A.R. Johnston:

Amino acid transmitters in the mammalian spinal cord.

Rev. of Physiol. 69 (1974) 97-188

Curtis, D.R., J.W. Phillis und J.C. Watkins:

Actions of amino acids on the isolated hemisected spinal cord
of the toad.

Brit. Journal of Pharmacol. 16 (1961) 262-283

Curtis, D.R. und J.C. Watkins:

The pharmacology of amino acids related to gamma-aminobutyric
acid.

Pharmacological Reviews 17 (1965) 347-391

Davidoff, R.A.:

Gamma-aminobutyric acid antagonism and presynaptic inhibition in the frog spinal cord.

Science 175 (1972a) 331-333

Davidoff, R.A.:

The effects of bicuculline on the isolated spinal cord of the frog.

Exp. Neurology 35 (1972b) 179-193

Davidoff, R.A. und M.H. Aprison:

Picrotoxin antagonism of the inhibition of interneurons by glycine.

Life Science 8 (1969) 107-112

Davidoff, R.A., M.H. Aprison und R. Werman:

The effects of strychnine on the inhibition of interneurons by glycine and GABA.

Int. J. Neuropharmac. 8 (1969) 191-194

Diamond, J. S. Roper and G.M. Yasargil:

The membrane effects, and sensitivity to strychnine, of neural inhibition of the Mauthner cell, and its inhibition by glycine and GABA.

Journal of Physiol. 232 (1973) 87-111

Eccles, J.C.:

Synaptic potentials of motoneurons.

J. Neurophysiol. 9 (1946) 87-120

Eccles, J.C.:

The physiology of synapses.

Springer Verlag, Berlin (1964)

Eccles, J.C. und J.L. Malcolm:

Dorsal root potentials of the spinal cord.

J. Neurophysiol. 9 (1946) 139-160

Ecker, A., R. Wiedersheim und E. Gaupp:

Anatomie des Frosches.

2. Abteilung, 2. Auflage, Vieweg Braunschweig 1899

Engberg, I. und A. Thaller:

On the interaction of picrotoxin with GABA and glycine in the spinal cord.

Brain Research 19 (1970) 151-154

Fadiga, E. und J.M. Brookhart:

Monosynaptic activation of different portions of the motor neuron membrane.

Am. Journal Physiol. 198 (1960) 693-703

Fadiga, E. und J.M. Brookhart:

Interactions of excitatory postsynaptic potentials generated at different sites on the frog motoneuron.

Journal of Neurophysiol. 25 (1962) 790-803

Fukami, Y.:

Postsynaptic potentials in toad's spinal motoneurons due to muscle afferent volleys.

Jap. Journal Physiol. 11 (1961) 596-604

Fukuya, M.:

Studies on some physiological properties of γ -aminobutyric acid and related compounds.

Jap. Journal Physiol. 11 (1961) 126-146

Graham, L.T., R.P. Shank, R. Werman und M.H. Aprison:

Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord.

Journal of Neurochemistry 14 (1967) 465-472

Grinell, A.D.:

A study of the interaction between motoneurons in the frog spinal cord.

Journal of Physiol. 182 (1966) 612-648

Grinell, A.D.:

Electrical interaction between antidromically stimulated frog motoneurons and dorsal root afferents: enhancement by gallamine and TEA.

Journal of Physiol. 210 (1970) 17-43

Groat, W.C. de:

The effects of glycine, GABA and strychnine on sacral parasympathetic preganglionic neurones.

Brain Research 18 (1970) 542-544

Hill, R.G., M.A. Simmonds und D.W. Straughan:

A comparative study of some convulsant substances as γ -aminobutyric acid antagonists in the feline cerebral cortex.

British Journal Pharmac. 49 (1973) 37-51

Hösli, L., H.L. Haas, und E. Hösli:

Taurine - a possible transmitter in the mammalian central nervous system.

Experientia 29 (1973) 743-744

Johnston, G.A.R.:

The intraspinal distribution of some depressant amino acids.

Journal of Neurochemistry 15 (1968) 1013-1017

Katz, B. und R. Miledi:

A study of spontaneous miniature potentials in spinal motoneurons.

Journal of Physiol. 168 (1963) 389-422

Kubota, K. und J.M. Brookhart:

Inhibitory synaptic potential of frog motor neurons.

American Journal Physiol. 204 (1963) 660-666

Kuno, M.:

Effects of strychnine on the intracellular potentials of spinal motoneurons of the toad.

Jap. Journal Physiol. 7 (1957) 42-50

Larson, M.D.:

An analysis of the action of strychnine on the recurrent IPSP and amino acid induced inhibitions in the cat spinal cord.

Brain Research 15 (1969) 185-200

Llinás, R. und R. Baker:

A chloride-dependent inhibitory postsynaptic potential in cat trochlear motoneurons.

Journal of Neurophysiol. 35 (1972) 484-492

Lux, H.D.:

Ammonium and chloride extrusion: hyperpolarizing synaptic inhibition in spinal motoneurons.

Science 173 (1971) 555-557

Nicoll, R.A. und J.L. Barker:

Effect of strychnine on dorsal root potentials and amino acid responses in frog spinal cord.

Nature 246 (1973) 224-225

Ozawa, S. und K. Tsuda:

Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in crayfish stretch receptor cell.

Journal of Neurophysiol. 36 (1973) 805-816

Roper, S. und J. Diamond:

Does strychnine block inhibition post-synaptically.

Nature 223 (1969) 1168-1169

Schmidt, R.F.:

Pharmacological studies on the primary afferent depolarization of the toad spinal cord.

Pflügers Archiv 277 (1963) 325-346

Schmidt, R.F.:

Presynaptic inhibition in the vertebrate central nervous system.

Erg. Physiol. 63 (1971) 20-101

Silver, M.L.:

The motoneurons of the spinal cord of the frog.

Journal of Comparative Neurology 77 (1942) 1-39

Sonnhof, U.:

A multi-barrelled coaxial electrode for iontophoresis and intracellular recording with a gold shield of the central pipette for capacitance neutralization.

Pflügers Archiv 341 (1973) 351-358

Steiner, F.A.:
Neurotransmitter und Modulatoren.
Thieme Verlag Stuttgart 1971

Tébécis, A.K. und J.W. Phillis:
The effects of topically applied biogenic monoamines on the
isolated toad spinal cord.
Comp. Biochem. Physiol. 23 (1967) 553-563

Tébécis, A.K. und J.W. Phillis:
The use of convulsants in studying possible functions of
amino acids in the toad spinal cord.
Comp. Biochem. Physiol. 28 (1969) 1303-1315

Timiras, P.S., D.B. Hudson und S. Oklund:
Changes in central nervous system; free amino acids with
development and aging.
Progress in Brain Research 40 (1973) 267-275

Werman, R., R.A. Davidoff und M.H. Aprison:
Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat.
Journal of Neurophysiol. 31 (1968) 81-95

Herrn Prof. Dr. G. ten Bruggencate danke ich für hilfreiche Gespräche und Anmerkungen, die mir die Abfassung dieser Arbeit erleichtert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Sonnhof für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und wertvolle Anleitung bei der experimentellen Durchführung.

Frl. L. Schindler danke ich für ihre hilfsbereite Mitarbeit und Frl. E. Spensberger für die Niederschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf:

Am 16.4.1951 wurde ich als Sohn des Dr. med. Günter Grafe und seiner Ehefrau Dr. med. Ursula Grafe in Berlin geboren.

In Berlin besuchte ich die Grundschule, trat dann 1961 in München in das Erasmus-Grasser-Gymnasium ein und legte dort 1970 meine Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Medizin, das ich nach dem Physikum im Frühjahr 1973 mit dem medizinischen Staatsexamen 1976 abschloß.

